UNTERSUCHUNGEN AM INSULINREZEPTOR VON ISOLIERTEN FETTZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Eichler
aus Wiesbaden

1980

UNTERSUCHUNGEN AM INSULINREZEPTOR VON ISOLIERTEN FETTZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Eichler
aus Wiesbaden

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	10. Oktober 1980
Dekan:	Prof. Dr. E.Reinhard
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. G.Weitzel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K.Eisele

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Günther Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.
Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und für die großzügige Unterstützung während dessen Bearbeitung.

Herrn Professor Dr. K.Eisele danke ich für die freundliche Überlassung synthetischer Peptide, Herrn Dr. S.Hörnle für die Überlassung der Insulin-A- und B-Ketten-S-Sulfonate. Herrn Diplombiochemiker W.Halfter und Herrn H.Hertfelder danke ich für die freundliche Überlassung der verschiedenen Insulinderivate.
Für die freundliche Überlassung der niedermolekularen Testsubstanzen danke ich Herrn Prof. Dr. H.Guglielmi, Frau Dr. B.Pfeiffer, Frau Dr. A.-M.Fretzdorff, Herrn Diplombiochemiker A.Hadjanghelou und Herrn Dr. W.Sarrazin.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0089

INHALT

A. Einleitung und Fragestellung 1

B. Fettzelltests 4
I. Material und Methoden 4
1. Abkürzungen 4
2. Material 5
3. Tiere 6
4. Geräte 6
5. Lösungen 7
6. Methoden 9
6.1. Entzinkung und Reinigung von Rinderinsulin 9
6.2. Präparation von ^{125}J-Insulin 10
6.3. Präparation von Fettzellen 12
6.4. Der Insulinrezeptortest an Fettzellen 13
6.4.1. Allgemeine Durchführung aller Tests 13
6.4.2. Bestimmung der unspezifischen Bindung 14
6.4.3. Bindungstests 14
6.4.4. Verdrängungstests 16

II. Ergebnisse 18
1. Radiojodierung von Insulin 18
2. Einfluß der Versuchsbedingungen auf das Ergebnis 20
2.1. Inkubationszeit 20
2.2. Zelldichte 22
2.3. ^{125}J-Insulinkonzentration 27
2.4. Einfluß des Puffers 32
2.4.1. Einfluß des pH 32
2.4.2. Einfluß des Puffertyps auf die Überlebensrate 34
2.4.3. Einfluß des Puffertyps auf die Insulinbindung 39
2.4.4. Einfluß der Glukosekonzentration 48
2.5. Einfluß von Adrenalin auf die Überlebensrate 49
2.6. Einfluß von Trypsininhibitor auf den Test 50

3. Verdrängungstests 51
3.1. Natives Rinderinsulin 57
3.2.1. Insulin-A- und B-Kettensulfonat 61
3.2.2. Partiell proteolytisch abgebaute Derivate 62
3.2.3. Methylester von Insulin und Despeptidinsulinen 62
3.3. Semisynthetische Insulinderivate 66
3.3.1. Despentapeptid(B26-30)-insuline 66
3.3.2. Destripeptid(B28-30)-insuline 66
3.4. Niedermolekulare Oligopeptide 71
4. Substanzen ohne Beziehung zur Insulinsequenz 73
4.1. Niedermolekulare Basen ohne Blutzuckeraktivität 73
4.2. Inositphosphatid 77
4.3. Niedermolekulare Basen mit Blutzuckeraktivität 81

III. Diskussion 86

C. Zusammenfassung 91

D. Literatur 93

A. Einleitung und Fragestellung

Im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen werden seit Jahren Untersuchungen zur Insulinaktivität durchgeführt. Mittels der Struktur-Wirkungsbeziehungen sollen Erkenntnisse über die Funktion und Notwendigkeit der Bauelemente der Primär- und Sekundärstruktur des Insulinmoleküls gewonnen werden. Dazu wurden eine Vielzahl von Verbindungen hergestellt, z.B. Partialsequenzen des Insulins (1.-4.), semisynthetische Insulinanaloga (5.-9.) und niedermolekulare Verbindungen mit insulinähnlicher Wirkung (10.-12.) und in ihrer biologischen Aktivität charakterisiert.
Als Aktivitätskriterien standen bisher neben den in-vivo-Tests (wie Blutzuckertest an Kaninchen, Ratte, Maus oder Mäusefalltest oder Zwerchfelltest an der Ratte) in-vitro-Tests an isolierten Rattenzwerchfellen, Nebenhodenfettgewebe der Ratte oder an isolierten Fettzellen zur Verfügung.
Besonders das letzte System bietet eine ganze Reihe insulinabhängiger Parameter zur Standardkontrolle größerer Probenmengen an, wie z.B. Glukoseaufnahme, Glukoseoxidation, Lipogenese, Antilipolyse, c-AMP-Konzentration, ATP-Konzentration.
Das Arbeiten mit Fettzellen bietet an Vorteilen:
Es handelt sich um ein gut charakterisiertes und eingehend untersuchtes Gewebe;
es bietet die gute Stimulierbarkeit der untersuchten Stoffwechseleffekte durch Insulin;
es ermöglicht die Herstellung einer relativ großen Zahl weitgehend gleicher, homogener Probenansätze bei vergleichsweise geringem Tierverbrauch;
die Präparation von isolierten Fettzellen wird in unserem Institut routinemäßig durchgeführt.
Da die bisher gemessenen Stoffwechselvorgänge keinen Einblick in die molekularen Vorgänge bei der Hormonaktivität des Insulins gestatten, wurde es notwendig, einen Test zu entwickeln, der die Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen des Insulins am Insulinrezeptor von Fettzellen erfaßt.
Daher soll das Schwergewicht dieser Arbeit auf der Entwicklung einer routinemäßig einsetzbaren Methode liegen, mit der man Aussagen über die Insulinaktivität von Proben bezüglich des

Insulinrezeptors gewinnen kann.
Dieser Test müßte in der Durchführung einem Radioimmuntest mit matrixgebundenem Antikörper ähneln, wobei letzterem die Insulinrezeptoren auf den Fettzellen entsprechen; das zu messende "Antigen" wird durch ^{125}J-Insulin dargestellt. Mit diesem Ansatz kann sowohl eine Konzentration nativen Insulins bestimmt werden als auch die "Kreuzreaktivität" von Analoga. Beachten muß man dabei, daß die Ergebnisse nur grob quantitativ sein können; denn sowohl eine Heterogenität in der Rezeptorpopulation auf einer Fettzelle (13.-19.) als auch negative Kooperativität zwischen den Rezeptoren (20.-40.) komplizieren eine Auswertung nach absoluten Bindungs- oder Inhibitorkonstanten bis zur Unmöglichkeit. Ein anschauliches Beispiel dafür ist die weite Streuung der von verschiedenen Arbeitsgruppen gemessenen Dissoziations"konstanten" für Insulin (41.). Es ist also angebracht, nur relative Werte unter konstanten Bedingungen gegen natives Insulin als Bezugssystem zu bestimmen. Mit dem optimierten Testverfahren sollen eine Reihe von Substanzen untersucht werden, deren Wirkung in anderen in-vivo- oder in-vitro-Systemen bekannt ist, um eine eventuelle Korrelation zwischen den verschiedenen biologischen Effekten erkennen zu können.
Die zu klärenden Fragen sind:

1. Bei den bisher veröffentlichten Rezeptortests an Fettzellen wurden nur Bruttowirkungen auf die Zellen ohne Berücksichtigung der Anteile toxischer oder membranwirksamer Effekte gemessen. Welche Parameter der Substanz-Zell-Wechselwirkung lassen sich mit einem optimierten Fettzelltest durch Variation von Präinkubationszeit, Inkubationszeit und Stoffkonzentration parallel erfassen? Wie zuverlässig sind die dabei erhaltenen Aussagen?
2. Welche Effekte auf die Rezeptoraktivität des Insulinmoleküls übt der partielle proteolytische Abbau zum Desoctapeptid-(B23-30)-insulin aus und welche der weitere Abbau zum Desnonapeptid(B22-30)-insulin?
Wie verhalten sich getrennte A- und B-Ketten-S-Sulfonate gegenüber dem Insulinrezeptor an Fettzellen? Bleibt noch ein Rest Bindungsaktivität übrig?

3. Wie verhalten sich die semisynthetischen Insulinderivate
Despentapeptid(B26-30)-insulin(B22-Ala),
Despentapeptid(B26-30)-insulin(B22-Lys),
Destripeptid(B28-30)-insulin(B22-Ala, B27-Ala)
Destripeptid(B28-30)-insulin(B22-Glu, B27-Ala)
gegenüber dem Insulinrezeptor? Lassen sich die in anderen Testsystemen gefundenen Effekte: Notwendigkeit des Arginin B22 und die 3-Stufen-Aktivitätszunahme bei der Kettenverlängerung B24 auf B26 (5.-7.)
auch im Insulinrezeptortest an Fettzellen bestätigen?

4. Können auch die kleinen Oligopeptide mit Beziehung zur Insulinsequenz Arg-Gly-Phe-Phe (B22-25) und Derivate,
Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala (B22-26) und
$(Gln\text{-}His\text{-}Leu\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Ser\text{-}His)_2$ (B4-10)
mit dem Insulinrezeptor in Wechselwirkungen treten, obwohl sie im Blutzuckertest keinen Effekt zeigen?

5. Wie verhalten sich niedermolekulare, nicht blutzuckersenkende basische Substanzen mit gewissen insulinähnlichen Wirkungen auf Fettzellen gegenüber dem Insulinrezeptor?(Als Beispiele für 3 verschiedene Verbindungsklassen wurden Spermidin, 6-Guanidinohexansäuredimethylamid und C_6-Homoagmatin (= 6-Guanidino-1-amino-hexan) ausgewählt.)

6. Welche Wirkung, speziell auf die Zellmembran, übt die niedermolekulare, nicht blutzuckersenkende, nichtbasische Verbindung Inositphosphatid aus?

7. Wirken die bekannten niedermolekularen blutzuckersenkenden Substanzen
Synthalin (= 1,10-Diguanidinodecan), Butylbiguanid und 11-Guanidinoundecansäuredimethylamid
direkt oder indirekt auf den Insulinrezeptor ein oder umgehen sie diesen?

B. Fettzelltests

I. Material und Methoden

1. Abkürzungen

EDTA-Na_2	Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz
TCA	Trichloressigsäure
KRB-Puffer	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
Tris	N-trishydroxymethyl-aminomethan
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
HEPES	(N-2-hydroxyethylpiperazin)-N-2-ethansulfonsäure
Gly	Glycin
Arg	L-Arginin
N-Ac-Arg	N-Acetyl-L-Arginin
Phe	L-Phenylalanin
Phe-NH_2	L-Phenylalaninamid
Tyr	L-Tyrosin
Ala	L-Alanin
ß-Ala	ß-Alanin
Lys	L-Lysin
Gln	L-Glutamin
His	L-Histidin
Leu	L-Leucin
Cys	L-Cystein
Ser	L-Serin
6HA	C_6-Homoagmatin (6-Guanidino-1-amino-hexan)
6G-DMA	6-Guanidohexansäure-dimethylamid
DOPI	Desoctapeptid-B23-30-Insulin
DNPI	Desnonapeptid-B22-30-Insulin
DPPI-Ala	Despentapeptid-B26-30-insulin(B22-Ala)
DPPI-Lys	Despentapeptid-B26-30-insulin(B22-Lys)
DTPI-Ala_2	Destripeptid-B28-30-insulin(B22-Ala,B27-Ala)
DTPI-Glu-Ala	Destripeptid-B28-30-insulin(B22-Glu,B27-Ala)
$I(OMe)_6$	Insulinhexamethylester
$DOPI(OMe)_5$	Desoctapeptid-B23-30-insulin-pentamethylester
$DNPI(OMe)_5$	Desnonapeptid-B22-30-insulin-pentamethylester
KNaPP	Kalium-Natrium-Phosphatpuffer

2. Material

Rinderinsulin 27 IE/mg Zinkgehalt ca.0,3% Farbwerke Höchst
Sephadex G-50 fine Pharmacia
Plastik-Reagensgläser 11 x 70 mm
16 x105 mm
21,5x100 mm
Eppendorf-Cups 400 µl Greiner Laborbedarf
$Na^{125}J$-Lösung 1mCi/10µl Amersham Buchler
Rinderserumalbumin Fraction V Powder 96-99% Albumin
Collagenase (Clostridiopeptidase A; E.C.3.4.24.3.)
von Clostridium hystoliticum
Trypsininhibitor aus Sojabohnen SIGMA Chemie GmbH
Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) Messer Griesheim
Essigsäure 100% zur Analyse
EDTA-Na_2 zur Analyse
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse
Dinatriumhydrogenphosphat zur Analyse (als Dodekahydrat)
Chloramin T zur Analyse
Natriumdisulfit reinst
Triton X 100 reinst
Trichloressigsäure zur Analyse
Natriumchlorid zur Analyse
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat zur Analyse
Tris zur Analyse
Glycylglycin zur Analyse
HEPES Puffersubstanz
Kaliumchlorid zur Analyse
Kalziumchlorid-dihydrat zur Analyse
Magnesiumsulfat-heptahydrat zur Analyse
D-Glukose-monohydrat für biochemische Zwecke
Dinonylphthalat für die Gaschromatographie
Äthanol 96%ig rein Merck
MOPS Puffersubstanz Calbiochem

Spermidin, C_6-Homoagmatin und 6-Guanidinohexansäure-dimethylamid wurden freundlicherweise von Herrn Diplombiochemiker A. Hadjanghelou zur Verfügung gestellt.
Die Tetra-, Penta-, Hexa- und Heptapeptide mit Beziehung zur Insulinstruktur wurden mir freundlicherweise von Herrn Professor Dr. K.Eisele überlassen, die Insulin-A- und B-Ketten-S-Sulfonate von Herrn Dr. S.Hörnle.
Die Despeptidinsuline, semisynthetischen Insulinderivate und Insulin- und Despeptidinsulinmethylester erhielt ich freundlicherweise von Herrn Diplombiochemiker W.Halfter und Herrn H.Hertfelder.
Butylbiguanid, Synthalin und Phosphatidylinositol wurden freundlicherweise von Herrn Dr.W.Sarrazin zur Verfügung gestellt.
Frau Dr. A.-M.Fretzdorff synthetisierte und überließ mir freundlicherweise das 11-Guanidinoundecansäure-dimethylamid.

3. Tiere

Männliche Ratten vom Stamm Sprague Dawley, Gewichtsklasse 135-165 g ; Versuchstierzuchtanstalt Tuttlingen.

4. Geräte

Eppendorf-Pipetten 5, 10, 20, 50, 100, 200, 1000 µl
Vortex
Glassäulen mit Fritte 10 x 300 mm und 15 x 1000 mm
LKB 7000 Ultrorac Fraktionssammler mit Durchflußphotometer 8300 UVICORD II
Servall-Zentrifuge mit SS 34 - Rotor
Beckmann Gamma 300 Gammacounter
Beckmann Microfuge B
Schütteltherмostat "GFL Mot"

5. Lösungen

5.1. Insulinreinigung und Entzinkung

a) 1 Mol/l Essigsäure

b) 25 mg/ml EDTA-Na_2 in 1 molarer Essigsäure

5.2. Radiojodierung von Insulin

I. 0,25 molarer KNaPP pH 7,6

Stammlösungen ansetzen von

a) $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (0,25 molar = 89,5 g/l)

b) KH_2PO_4 (0,25 molar = 34,0 g/l)

Zu Lösung a) wird so lange Lösung b) zugegeben, bis pH 7,6 erreicht ist.

II. 0,1 molarer KNaPP pH 7,4

Stammlösungen ansetzen von

a) $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (0,1 molar = 35,8 g/l)

b) KH_2PO_4 (0,1 molar = 13,6 g/l)

Zu Lösung a) wird so lange Lösung b) zugegeben, bis pH 7,4 erreicht ist.

III. 0,1 molarer KNaPP/2% Albumin/0,5% Triton X 100 pH 7,4

Stammlösungen ansetzen von

a) 4 ml Lösung Ia) + 2 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 1 ml 5%iges Triton X 100 in H_2O + 3 ml Aq.bidest.

b) 4 ml Lösung Ib) + 2 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 1 ml 5%iges Triton X 100 in H_2O + 3 ml Aq.bidest.

Zu Lösung a) wird so lange Lösung b) zugegeben, bis pH 7,4 erreicht ist.

IV. 0,1 molarer KNaPP/0,1% Albumin/0,03% Triton X100 pH 7,4

Stammlösungen ansetzen von

a) 200 ml Lösung Ia) + 5 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 3 ml 5%iges Triton X 100 in H_2O + Aq.bidest. ad 500 ml

b) 40 ml Lösung Ib) + 1 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 0,6 ml 5%iges Triton X 100 in H_2O + Aq.bidest.ad 100 ml

Zu Lösung a) wird so lange Lösung b) zugegeben, bis pH 7,4 erreicht ist.

V. Insulinlösung

0,8 mg gereinigtes und entzinktes Rinderinsulin werden in 1 ml Lösung II gelöst.

VI. Chloramin T - Lösung

50 mg Chloramin T werden in 50 ml Aq.bidest. gelöst.

VII. Natriumdisulfit - Lösung

150 mg Natriumdisulfit werden in 50 ml Aq.bidest. gelöst.

VIII. 0,1 molarer KNaPP/1% Albumin pH 7,4

Stammlösungen ansetzen von

a) 4 ml Lösung Ia) + 1 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 5 ml Aq.bidest.

b) 4 ml Lösung Ib) + 1 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 5 ml Aq.bidest.

Zu Lösung a) wird so lange Lösung b) zugegeben, bis pH 7,4 erreicht ist.

IX. 20%ige TCA - Lösung

20 g TCA werden in 80 ml Aq.dest. gelöst.

X. 0,9% NaCl/10% Albumin

90 mg NaCl werden in 10 ml 10%igem dialysiertem Albumin gelöst.

5.3. Präparation von Fettzellen

Stammlösung ansetzen von

5,1 g NaCl + 1,94 g K_2HPO_4 + 2,4 g Tris + 0,1 g Glukose + Aq.bidest ad 500 ml, mit HCl conz. auf pH 7,8 einstellen.

Zum Gebrauch werden

5 ml Stammlösung + 3,5 ml 10%iges dialysiertes Albumin + 1,5 ml Aq.bidest. gemischt.

Der pH wird kontrolliert und gegebenenfalls auf 7,8 eingestel

Zur Gewebsdesintegration werden

7 - 9 mg Collagenase und 4 - 5 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen in 3 ml gebrauchsfertiger Lösung gelöst.

5.4. Insulinrezeptortests an Fettzellen

Stammlösungen anstzen von

a) NaCl (0,154 Mol/l = 9 g NaCl/l)

b) KCl (0,154 Mol/l = 11,5 g KCl/l)

c) $CaCl_2$ (0,11 Mol/l = 16,2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$/l)

d) KH_2PO_4 (0,154 Mol/l = 21,1 g KH_2PO_4/l)

e) $MgSO_4$ (0,154 Mol/l = 38,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

f) GAN-Mix (3 g Glukose + 0,9 g NaCl in 100 ml 5%igem dialysiertem Albumin)

g1) $NaHCO_3$ (0,154 Mol/l = 13 g $NaHCO_3$/l , vor Gebr. 30 sec. mit CO_2 begast)

g2) Glycylglycin (0,154 Mol/l = 20,3 g Glycylglycin/l)

g3) Tris-HCl (0,154 Mol/l = 18,6 g Tris ,mit Aq.bidest. ad 1 l , mit HCl conz. pH 7,5 einstellen)

g4) MOPS (0,154 Mol/l = 32,1 g MOPS/l , mit NaOH conz. pH auf 7,5 einstellen)

g5) HEPES (0,154 Mol/l = 36,7 g HEPES/l , mit NaOH conz. pH auf 7,5 einstellen)

Zum Gebrauch werden

98 ml a)
+ 4 ml b)
+ 3 ml c)
+ 1 ml d)
+ 1 ml e)
+ 2 ml f) gemischt.

Dann werden je nach Art des gewünschten Puffers

21 ml der entsprechenden Pufferstammlösung g1) - g5)

zugegeben, gemischt und der pH mit 1molarer NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt.

6. Methoden

6.1. Entzinkung und Reinigung von Rinderinsulin

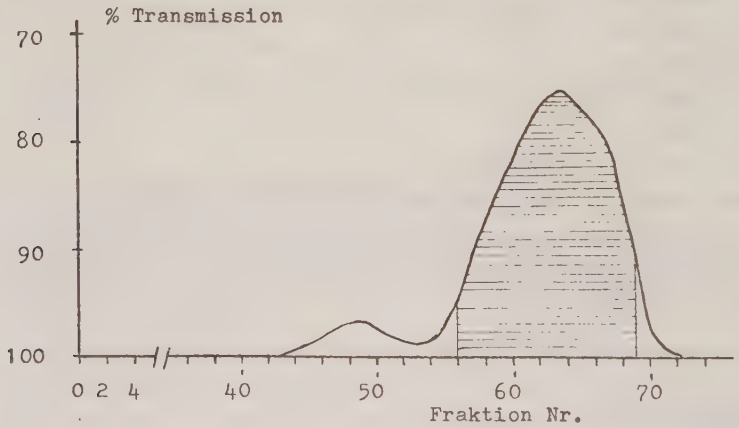
50 mg Rinderinsulin (kristallin, 27 IE/mg, Zinkgehalt ca.0,3%) werden in 1 ml 1molarer Essigsäure gelöst und dazu 25 mg $EDTA\text{-}Na_2$ zugegeben.

Eine Säule (15 x 1000 mm) mit Sephadex G-50 fine und äquilibriert mit 1molarer Essigsäure wird vorbereitet, indem 2 ml einer Lösung von 50 mg $EDTA\text{-}Na_2$ in 1molarer Essigsäure aufgetragen werden, die man bis auf die Geloberfläche einsikkern läßt.

Dann wird die Insulinlösung auf die Chromatographiesäule gegeben und mit 1molarer Essigsäure eluiert.

Es werden Fraktionen zu je ca. 2 ml (22 Tropfen) aufgefangen und die Elution mittels UVICORD bei 278 nm kontrolliert. Ein typisches Elutionsdiagramm ist in Abb.1 dargestellt. Die Fraktionen im schraffierten Bereich des Hauptpeaks werden vereinigt und lyophilisiert. Erhalten werden so zwischen 35 und 40 mg gereinigtes entzinktes Insulin, die alsbald aufgebraucht werden sollten. Rechromatographie nach 14 Tagen zeigt einen Vorpeak gleichen Ausmaßes wie bei der ersten Reinigung, Rechromatographie mehrerer vereinigter Vorpeaks ergibt auch nach Lagerung keine Aufspaltung in Unterpeaks, so daß eine kovalente Bindung anzunehmen ist.

Abb.1



6.2. Präparation von ^{125}J-Insulin

Die Markierung des Insulins mit ^{125}J erfolgte nach der Methode von Hunter und Greenwood in der Modifikation von Koch (42) Dabei wird aus Na^{125}J durch Oxidation mit Chloramin T elementares Jod freigesetzt, welches Tyrosinreste des Insulins in o-Stellung zur OH-Gruppe substituiert (43.,44.).
Nur Monojodinsulin behält die volle biologische Aktivität bei (45.), deshalb muß bei der Kopplung mit Insulinüberschuß gearbeitet werden.

Nach Koch werden in einem Ansatz auf $6,4 \cdot 10^{-10}$Mol ^{125}J-$6,9 \cdot 10^{-10}$Mol Insulin (4 µg) eingesetzt, in einer Variation des Verfahrens $1,4 \cdot 10^{-9}$Mol Insulin (8 µg). Die eingesetzten Mengen waren von Chloramin T $7,1 \cdot 10^{-8}$Mol und von Natriumdisulfit $3,2 \cdot 10^{-7}$Mol.
Der Kopplung folgt eine Abtrennung des unumgesetzten ^{125}J- und oxidativ entstandener Polymerprodukte vom eigentlichen ^{125}J-Insulin durch Chromatographie an Sephadex G-50 fine.

a) Jodierungsvorschrift nach (42,).
In ein Plastikreagensglas (11 x 70 mm) werden nacheinander pipettiert:
1 mCi $Na^{125}J$ in 10 µl Volumen
+ 100 µl 0,25molarer KNaPP pH 7,6
+ 10 µl gereinigtes Insulin in 0,1molarem KNaPP pH 7,4
+ 20 µl Chloramin T in H_2O (1 mg/ml)
Rühren (Vortex), 30 sec. warten, dann
+ 20 µl Natriumdisulfit in H_2O (3 mg/ml)
Rühren (Vortex).
b) Trennung über Sephadex G-50 fine
Zu den 160 µl der Reaktionslösung werden sofort nach Reaktionsende 10 µl von 0,1molarem KNaPP/2% Albumin/0,5% Triton zugegeben,gerührt (Vortex), 15 Minuten stehen gelassen,mit einer Pipette aufgenommen und auf eine Säule (10 x 300 mm), gefüllt mit Sephadex G-50 fine, äquilibriert mit Elutionspuffer (0,1molarer KNaPP/0,1% Albumin/0,03% Triton X 100), aufgetragen.
Das Reaktionsgefäß wird mit 50 µl Elutionspuffer nachgespült und diese ebenfalls auf die Säule gegeben.
Eluiert wird bei $4^{o}C$ mit einer Durchlaufrate von 12 - 15 ml pro Stunde, das Eluat wird in Fraktionen von ca. 1 ml am Fraktionssammler (LKB 7000 Ultrorac) aufgefangen.
Zum Aufstellen des Elutionsdiagrammes entnimmt man jeder Fraktion 5 µl, mißt diese am Gamma-Zähler aus und verwendet sie anschließend zur TCA-Fällung.
c) TCA-Fällung
Zu der Probe werden 1 ml 1%iges Albumin in 0,1molarem KNaPP und, nach dem Mischen, 1 ml 20%iger TCA in H_2O gegeben.

Es wird gut gemischt (Vortex) und durch Ausmessen am Gamma-Zähler die gesamte Radioaktivität unter Berücksichtigung der Quencheffekte bestimmt. Dann wird 10 Minuten zentrifugiert (9000 rpm, Servall-Zentrifuge, SS 34-Rotor), abdekantiert und die Radioaktivität im Pellet gemessen.

d) Konservierung des ^{125}J-Insulins

Alle Fraktionen des Hauptpeaks mit mehr als 200000 cpm/5 µl werden vereinigt, pro ml mit 100 µl 10%igem Albumin in 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt und gut gemischt (Vortex). Dann wird die Lösung in 1 ml-Portionen eingefroren und bei -30°C bis zum Gebrauch, längstens 6 Wochen, gelagert. Direkt vor Gebrauch wird aufgetaut und mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

6.3. Präparation von Fettzellen

Die Präparation von Fettzellen aus dem epididymalen Fettgewebe von Ratten erfolgte nach einer in Anlehnung an J.Gliemann, W.Heptner, O.Christ, J.Hahn und O.Martini im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen entwickelten Vorschrift (12.):

Vier männliche Ratten vom Stamm Sprague Dawley im Gewichtsbereich zwischen 135 und 165 g werden durch Genickschlag getötet und decapitiert. Das entnommene Nebenhodenfettgewebe wiegt zusammen ca. 1,5 g. Es wird sofort in 3 ml vorbereiteter Collagenaselösung - bestehend aus Tris-Inkubationspuffer pH 7,8 , 7 - 9 mg Collagenase und 4 - 5 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen - suspendiert, 30 sec. mit Carbogen begast und nach Verschließen des Gefäßes eine Stunde im Schüttelthermostaten bei 37°C inkubiert.

Danach wird das desintegrierte Gewebe durch ein Nylonsieb in ein Plastikreagensglas (16 x 105 mm) filtriert, mit ca. 10 ml KRB-Puffer (auf 37°C vorgewärmt) verdünnt und in der Stock-Zentrifuge zentrifugiert (50 x g, 20 sec.). Dabei sammeln sich die Fettzellen an der Oberfläche, und die Unterphase kann mittels eines Silikonschlauches (2 x 1 mm) und einer 20 ml-Injektionsspritze entfernt werden.

Die Zellen werden in der beschriebenen Weise noch 4 mal mit vorgewärmtem KRB-Puffer gewaschen, und man erhält nach dem

letzten Absaugen ca. 2 ml gepackter Zellen. Diese werden in 2 ml KRB-Puffer suspendiert, in ein Plastikreagensglas (21,5 x 100 mm) überführt, und diese "Stammsuspension" kann auf die Testansätze verteilt werden. Dabei ist zur Erzielung einer homogenen Suspension auf dauerndes kräftiges Schütteln des Gefäßes zu achten, da die Fettzellen dazu neigen, sich an der Oberfläche zu sammeln.

6.4. Der Insulinrezeptortest an Fettzellen

6.4.1. Allgemeine Durchführung aller Tests

Ein Metallständer wird mit bis zu 14 Plastikreagensgläsern (21,5 x 100 mm) beschickt und in jedem dieser Gefäße 1 ml Testpuffer pH 7,4 vorgelegt. Dazu kommen 200 µl der Fettzell-"Stammsuspension". Nach dem Verschließen der Gefäße mit Silikonstopfen wird der Ständer im Schüttelthermostaten bei 37°C und einer Frequenz von 27 pro Minute inkubiert.
Zu jedem Ansatz werden 100 µl einer Lösung von Testsubstanz in 0,9%iger Kochsalzlösung, bei den Leerwerten nur 100 µl 0,9%iger Kochsalzlösung zugegeben und eine geeignete, je nach Versuchsziel variierte oder konstante Zeit präinkubiert. Dann wird durch Zugabe einer geeigneten Menge ^{125}J-Insulin in 100 µl KNaPP/NaCl-Lösung die eigentliche Inkubation gestartet, welche eine geeignete, je nach Versuchsziel variierte oder konstante, Zeit dauert. Beendet wird die Inkubation dadurch, daß jedem Ansatz unter kräftigem Schütteln 6 aliquote Teile zu je 200 µl entnommen werden, die in 400 µl-Eppendorf-Cups mit je 100 µl vorgelegtem Dinonylphthalat gegeben werden. Durch eine halbe Minute Zentrifugieren in einer Beckmann Microfuge B trennt das Dinonylphthalat die Fettzellen vom wäßrigen Inkubationsmedium ab. Die Eppendorf-Cups werden in einem Äthanol-Trockeneis-Kältebad eingefroren, mit einer scharfen Klinge in der Mitte der Dinonylphthalatphase durchtrennt und Ober- wie Unterphase separat in je ein Plastikreagensglas (11 x 70 mm) gegeben und diese, nach Verschließen mit Plastikstopfen, am Gamma-Zähler ausgemessen.

6.4.2. Bestimmung der unspezifischen Bindung

Als "unspezifische Bindung" bezeichnet man die Menge an ^{125}J-Insulin, die auch in Gegenwart eines großen Überschusses von nativem Insulin nicht von den Zellen verdrängt werden kann. Als ausreichender Überschuß wurde für dieses Testsystem eine Konzentration von 37,4 µMol/l nativem Insulin gegenüber 82 pMol/l ^{125}J-Insulin ermittelt. Diese Konzentration wird erhalten, wenn man 100 µl des Testpuffers wegläßt und statt dessen 10 Minuten vor Start der Inkubation mit ^{125}J-Insulin 100 µl einer Lösung von 3 mg/ml nativem Insulin in 0,9%iger Kochsalzlösung zugibt.

Tab.1 Allgemeines Vorgehen nach Abschnn. 6.4.1. und 6.4.2.

Zugabe:	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung
KRB-Puffer	1000 µl	900 µl
Zellsuspension	200 µl	200 µl
Testsubstanzlsg. oder Saline	100 µl	100 µl
	Präinkubation	(Präinkubation)
Natives Insulin (3 mg/ml)	---	100 µl 10 Min. Präinkub.
^{125}J-Insulin	100 µl	100 µl
	Inkubation	
Entnahme:	6 x 200 µl	6 x 200 µl

6.4.3. Bindungstests

Bindungstests sind kinetische Tests, bei denen das Bindungsverhalten von ^{125}J-Insulin an den Insulinrezeptoren von Fettzellen in Gegenwart von Testsubstanzen in Zeitabhängigkeit bestimmt wird.

Dabei unterscheidet man die Abhängigkeit der Bindung - spezifisch und unspezifisch - von der Präinkubationszeit mit der

Testsubstanz, kurz "Bestimmung der Überlebenszeit" genannt, und die Abhängigkeit der Bindung - spezifisch und unspezifisch - von der Inkubationszeit mit ^{125}J-Insulin.
Konstant gehalten wird in beiden Fällen die Konzentration der Testsubstanz.

6.4.3.a Bestimmung der Überlebenszeit von Fettzellen in Gegenwart von Testsubstanzen

Die Vorgehensweise ist in Tab.2 dargestellt:

Tab.2

Zugabe:	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung
KRB-Puffer	1000 µl	900 µl
Zellsuspension	200 µl	200 µl
Testsubstanz	100 µl	100 µl
	Präinkubation zwischen 5 und 65 Min.	
Natives Insulin (3 mg/ml)	---	100 µl 10 Min. Präinkub.
^{125}J-Insulin	100 µl	100 µl
30 Minuten	I n k u b a t i o n	
Entnahme:	6 x 200 µl	6 x 200 µl

Die 10 Minuten Präinkubationszeit mit nativem Insulin bei der Bestimmung der unspezifischen Bindung gehen von der Präinkubationszeit mit der Testsubstanz ab. Bei der kürzesten Präinkubationszeit wird das native Insulin vor der Testsubstanz zugegeben.

6.4.3.b Bestimmung der Bindung von ^{125}J-Insulin an Fettzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Vorgehensweise ist in Tab.3 dargestellt:

Tab.3

Zugabe:	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung
KRB-Puffer Zellsuspension Testsubstanz Natives Insulin (3 mg/ml)	1000 µl 200 µl 100 µl ---	900 µl 200 µl 100 µl 100 µl
	10 Minuten Präinkubation	
^{125}J-Insulin	100 µl	100 µl
	Inkubation zwischen 5 und 65 Min.	
Entnahme:	6 x 200 µl	6 x 200 µl

6.4.4. Verdrängungstests

Verdrängungstests sind stationäre Tests im Gleichgewicht, bei denen das Bindungsverhalten von ^{125}J-Insulin an die Insulinrezeptoren von Fettzellen in Abhängigkeit von der Testsubstanzkonzentration bestimmt wird.

Als Testsubstanzlösung werden dazu bei verschiedenen Ansätzen verschiedene Stufen einer Verdünnungsreihe der Testsubstanz zugegeben, zur Ermittlung der "maximalen Bindung" statt Substanzlösung nur 0,9%ige NaCl-Lösung, zur Ermittlung der "unspezifischen Bindung" stattdessen eine Lösung von 3 mg/ml nativem Insulin.

Die Vorgehensweise ist in Tab.4 dargestellt:

Tab.4

Zugabe	Maximale Gesamtbindung	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung
KRB-Puffer	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Zellsuspens.	200 µl	200 µl	200 µl
0,9% NaCl-L.	100 µl	---	---
Testsubstanz	---	100 µl	---
Nat.Insulin (3 mg/ml)	---	---	100 µl
	10 Minuten Präinkubation		
^{125}J-Insulin	100 µl	100 µl	100 µl
	30 Minuten I n k u b a t i o n		
Entnahme:	6 x 200 µl	6 x 200 µl	6 x 200 µl

Es ist sinnvoll, die Verdünnungsreihe der Testsubstanz möglichst eng in den Bereich zu verlegen, in dem die Hälfte des spezifisch gebundenen ^{125}J-Insulins verdrängt wird. Dazu ist ein Vortest mit großen Intervallen (1:10:100:1000:... Verdünnungen einer ca. 20 - 40 µmolaren Lösung) nötig, der analog durchgeführt wird.

II. Ergebnisse

1. Radiojodierung von Insulin

Die Methode wurde ohne Änderung der Vorgehensweise von Koch (42.) übernommen. Es wurden auch Elutionskurven ähnlich den von Koch dargestellten erhalten, und auch die TCA-Fällbarkeit verhielt sich identisch (Abb.2).
Jedoch erschien mir die Kopplungsrate von ca. 70%, bezogen auf eingesetztes $^{125}J^-$, zu gering, und es wurde daher noch ein Versuch der Kopplung bei doppelter eingesetzter Insulinmenge durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Flächen unter den Peaks der Radioaktivitäts-gegen-Elutionsvolumen-Kurve miteinander verglichen, indem sie in % der gesamten zur Kopplung eingesetzten Radioaktivität umgerechnet wurden.
Die anschließende Tab.5 und das zugehörige Diagramm (Abb.3) zeigen, daß die Ausbeute an Radiojodinsulin um 10% erhöht wird auf Kosten des Jodidpeaks, während sich beim Polymer-Vorpeak nichts ändert.
Obwohl bei dem zweiten Versuch die Konzentration an unmarkiertem Insulin im Endprodukt sicher mehr als doppelt so hoch war als bei dem ersten Versuch, konnte in einem anschließenden Bindungstest an Fettzellen kein signifikanter Unterschied im Bindungsverhalten beider Chargen festgestellt werden.

Tab.5

Insulin eingesetzt	n	Anteil an der Gesamtradioaktivität		
		Vorpeak	Hauptpeak	Jodidpeak
4,0 µg	2	9 %	64 %	27 %
8,0 µg	3	8 %	74 %	18 %

Abb.2

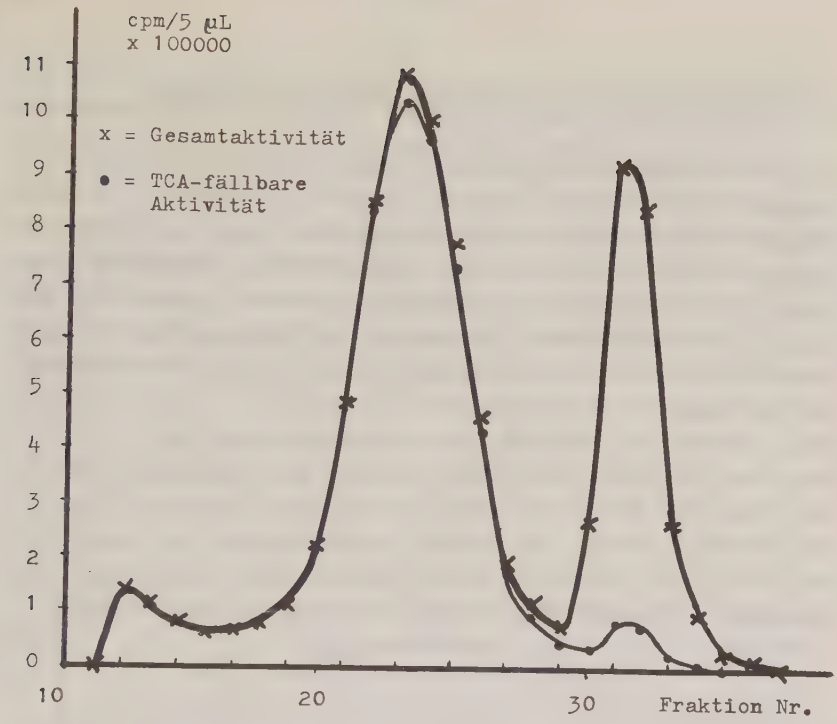
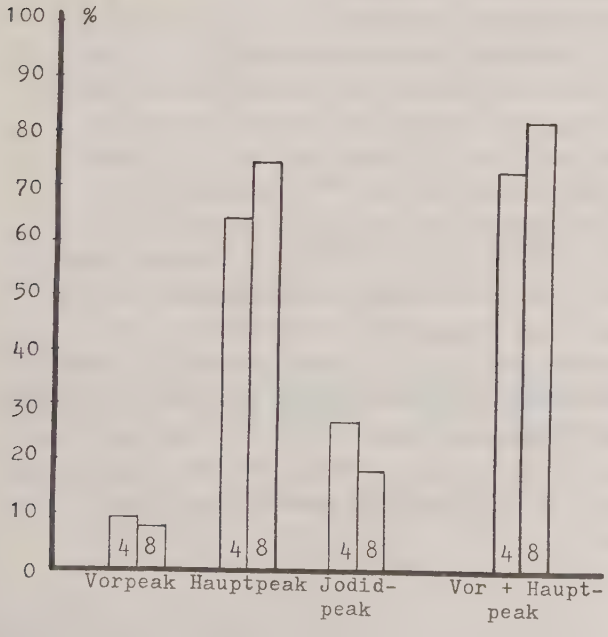

cpm/5 µL
x 100000
x = Gesamtaktivität
• = TCA-fällbare Aktivität
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
10
20
30
Fraktion Nr.

Abb.3


100
%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4
8
Vorpeak
Hauptpeak
Jodid-peak
Vor + Haupt-peak

2. Einfluß der Versuchsbedingungen auf das Ergebnis

Der Insulinrezeptor-Bindungstest an Fettzellen ist kein grundlegend neuer Test. Vor allem Gliemann und Gammeltoft (41.,46., 47.) haben verschiedene Vorschriften für seine Durchführung gegeben. Dennoch ist es nicht sinnvoll, diese für ganz spezielle Fragestellungen ausgearbeiteten Methoden einfach zu übernehmen, sondern vielmehr erwünscht, die Methoden den eigenen Erfordernissen und instrumentellen Möglichkeiten anzupassen und an diesen zu optimieren.
Unter diesem Gesichtspunkt wurde die Grundvorschrift von Wieringa und Krans (48.) nach Gliemann und Gammeltoft (41.) im großen und ganzen zwar beibehalten, entscheidende Punkte wie Inkubationszeit, Zelldichte, Puffereinfluß und andere mehr unter den gegebenen Bedingungen kontrolliert, um in den folgenden Versuchen jeweils die optimalen Parameter wählen zu können.

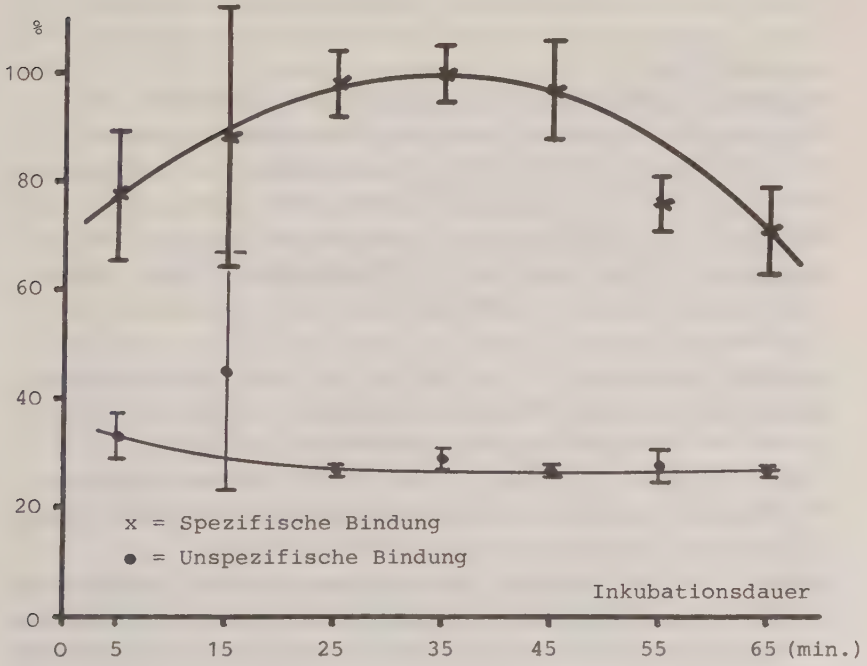
2.1. Inkubationszeit

Es wurde die Bindung von ^{125}J-Insulin an Fettzellen als Funktion der Inkubationszeit bestimmt.
Vorgegeben war die Inkubationstemperatur von 37^{o}C,um den frisch isolierten Fettzellen Temperatursprünge zu ersparen und zur besseren Vergleichbarkeit mit dem Glukoseoxidationstest. Konstante Parameter blieben der KRB-Puffer pH 7,4 , die Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^{5}$Zellen/ml und die zugegebene Radioaktivität entsprechend 82 pMol ^{125}J-Insulin/l .
Zwei parallel durchgeführte Meßreihen, von denen eine 37,4 nMol natives Rinderinsulin/ml enthielt, dienten dazu, einmal die gesamte, zum anderen die unspezifische Bindung des ^{125}J-Insulins zu ermitteln.
Die Inkubation begann mit der Zugabe des markierten Hormons und endete mit dem Abzentrifugieren durch das Dinonylphthalatpolster. Variable dieses Experimentes war die zwischen diesen beiden Fixpunkten liegende Zeit, während der die Inkubationsgefäße in einem bei 37^{o}C thermostatisierten Wasserbad geschüttelt wurden.

Die am Gamma-Counter ausgemessenen Zellphasen lieferten die Ergebnisse für die gesamte und die unspezifische Bindung. Die spezifische Bindung errechnet sich durch Subtraktion aus diesen Werten: $X_{spez.} = X_{gesamt} - X_{unspezifisch}$

Zur besseren Darstellung werden die Werte in %-Einheiten angegeben, wobei der Maximalwert als 100% gesetzt wurde. Tab.6 und Abb.4 zeigen das Ergebnis dieser Untersuchung. Es zeigt sich ein Maximum zwischen 25 und 45 Minuten. Als Konsequenz daraus wird in den folgenden Versuchen stets 35 Minuten mit ^{125}J-Insulin inkubiert.

Abb.4



Tab.6

Inkubations-dauer (min)	Spezifische Bindung (%)	n	Unspezifische Bindung (%)	n
5	77 ± 12	5	33 ± 4	5
15	88 ± 24	5	45 ± 22	5
25	98 ± 6	5	27 ± 1	5
35	100 ± 5	5	29 ± 2	5
45	97 ± 9	5	27 ± 1	5
55	76 ± 5	5	28 ± 3	5
65	71 ± 8	5	27 ± 1	5

2.2. Zelldichte

Es wurde die Bindung von ^{125}J-Insulin an Fettzellen als Funktion der Zelldichte bestimmt. Dazu wurde von einer frischen Fettzellpräparation eine 6-stufige Verdünnungsreihe angesetzt, indem die folgende Stufe immer eine 1 : 1 - Verdünnung der vorhergehenden darstellte. Von jeder Zellsuspension wurden parallel die Gesamtbindung und in Gegenwart von 37,4 nMol nativem Insulin/ml die unspezifische Bindung ermittelt.

Aus der Verdünnung 1 : 16 (bezogen auf die Stammsuspension) wurde ein aliquoter Teil entnommen und in einer Zählkammer unter dem Mikroskop die Zellzahl pro ml bestimmt.

Diesem Wert von rund $2{,}5 \cdot 10^5$ Fettzellen/ml wurden - unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren - die Zelldichten der übrigen Verdünnungsstufen zugrunde gelegt.

Abb.5 zeigt das Ergebnis des Bindungstests: Aus Gründen der graphischen Vereinfachung wurden die Werte auch hier in %-Einheiten dargestellt. Dabei entspricht 1% einer gebundenen Aktivität von 34 cpm.

Abb.5a entspricht der vorhergehenden, doch wurden die gebundenen Aktivitäten als % der zugegebenen Gesamtaktivität aufgetragen.

Abb.6 zeigt den Verlauf der Standardabweichung in % der zugehörigen Meßwerte als Funktion der Zelldichte.
Abb.6a zeigt den Verlauf der unspezifischen Bindung in % der spezifischen Bindung als Funktion der Zelldichte.
Abb.7 zeigt den Verlauf des Quotienten aus gebundenem ^{125}J-Insulin (in cpm) und Zelldichte als Funktion der Zelldichte.
Folgerungen aus diesen Ergebnissen:
Die spezifische Bindung erweist sich im untersuchten Bereich als lineare Funktion der Zelldichte, während dies für die unspezifische Bindung nur im Bereich von 10^6 bis $4 \cdot 10^6$ Zellen pro ml zutrifft.
Diese Tatsache ermöglicht es, in späteren Experimenten Fettzellpräparationen einzusetzen, ohne vorher die genaue Zelldichte mikroskopisch zu bestimmen; diese Zeitersparnis wirkt sich auf die Vitalität der Zellen sicherlich positiv aus.
Aus der maximalen spezifischen Bindung läßt sich die Zelldichte im Versuchsansatz ebenfalls ermitteln bzw. mit einem Korrekturfaktor auf eine standardisierte Zellzahl bringen.
Als Konsequenz daraus werden in den künftigen Ergebnissen die Meßwerte mit dem Faktor $\frac{100}{\text{maximale spez. Bindung}}$ multipliziert als %-Einheiten angegeben.
Aus Abb.6 geht hervor, daß die Standardabweichungen, die vorwiegend auf Pipettierfehler der nicht absolut homogenen Fettzellsuspension zurückzuführen ist, oberhalb einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$/ml minimal und nahezu konstant ist.
Ähnlich verhält es sich auch mit dem Verhältnis aus unspezifischer und spezifischer Bindung, wo in Abb.6a oberhalb von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml minimale Werte zu sehen sind.
Aus diesen beiden letzten Ergebnissen ist ersichtlich, daß der günstigste Zelldichtenbereich für Versuche oberhalb $2 \cdot 10^6$ liegt, da der für Proportionalitätsmessungen wichtige spezifische Bindungsbereich dort den größten Teil der Gesamtbindung bei geringstmöglicher Fehlerstreuung ausmacht.
Abb.7 liefert ein weiteres Argument für das Arbeiten bei Zelldichten oberhalb $2 \cdot 10^6$/ml , da in diesem Bereich die spezifische Bindung pro Zelle fast nicht mehr zelldichtenabhängig ist, das heißt, daß unter dem Postulat mehrerer Rezeptorklassen das System genügend weit vom Sättigugszustand

entfernt ist, um nur an den hochaffinen Rezeptoren Veränderungen empfindlich anzuzeigen. (Bei hoher Rezeptorkonzentration werden zuerst die Rezeptoren mit hoher Affinität abgesättigt, dann erst die mit niedriger Affinität.)
Praktische Konsequenzen dieses Resultats:
Die gewünschte Zelldichte von mehr als $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml im Versuchsansatz wird erzielt, wenn die aus einer Menge von ≥ 1,5 g Fettgewebe isolierten Fettzellen auf insgesamt 4 ml suspendiert werden und von dieser Suspension 0,2 ml auf 1,4 ml Inkubationsgemisch aufgefüllt werden.

Abb.6 Größe der Standardabweichung in % des zugehörigen Wertes als Funktion der Zelldichte
x = Spezifische Bindung
● = Unspezifische Bindung

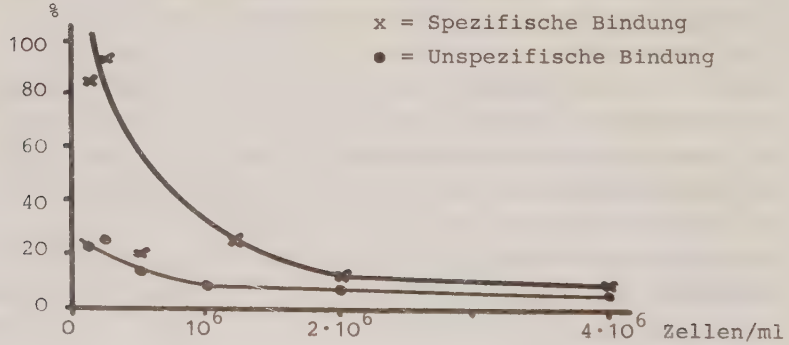


Abb.6a Unspezifische Bindung in % der zugehörigen spezifischen Bindung als Funktion der Zelldichte.

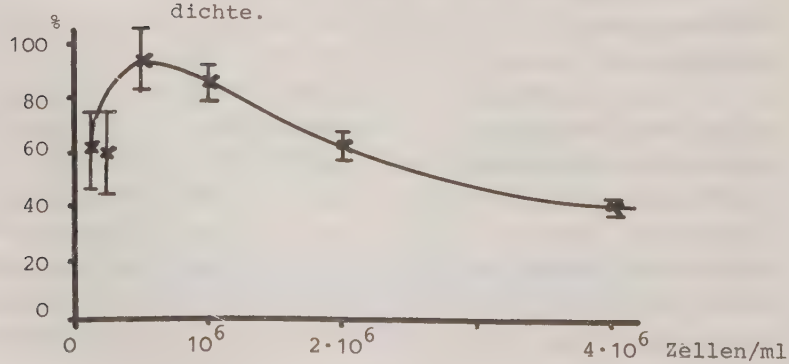


Abb.5

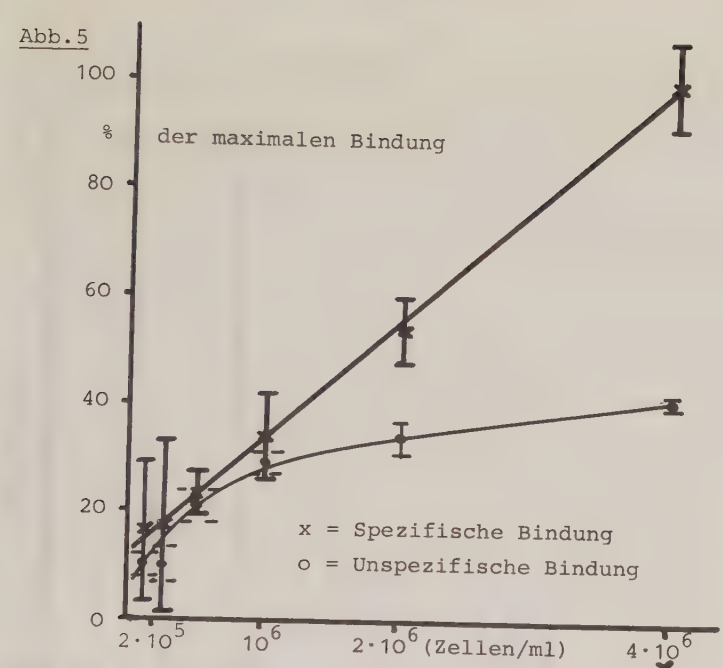

100
%
der maximalen Bindung
80
60
40
20
0
x = Spezifische Bindung
o = Unspezifische Bindung
2·10^5
10^6
2·10^6 (Zellen/ml)
4·10^6

Abb.5a

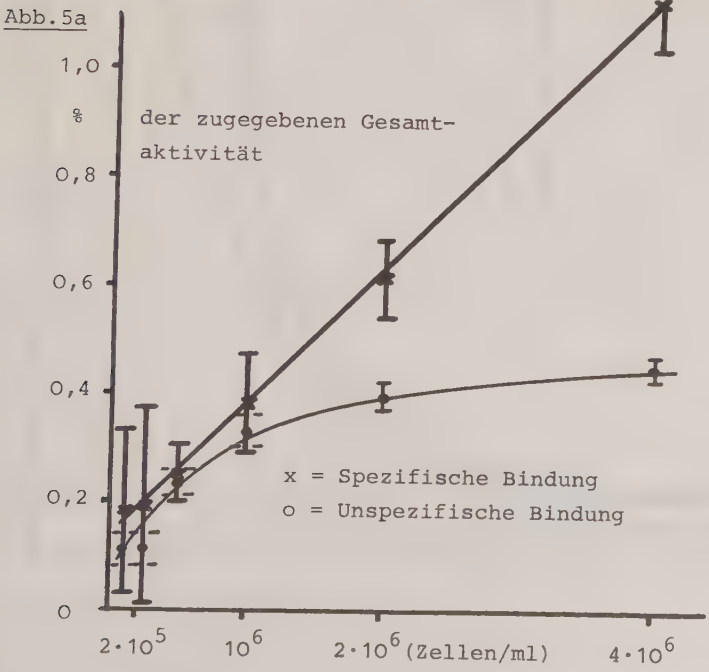
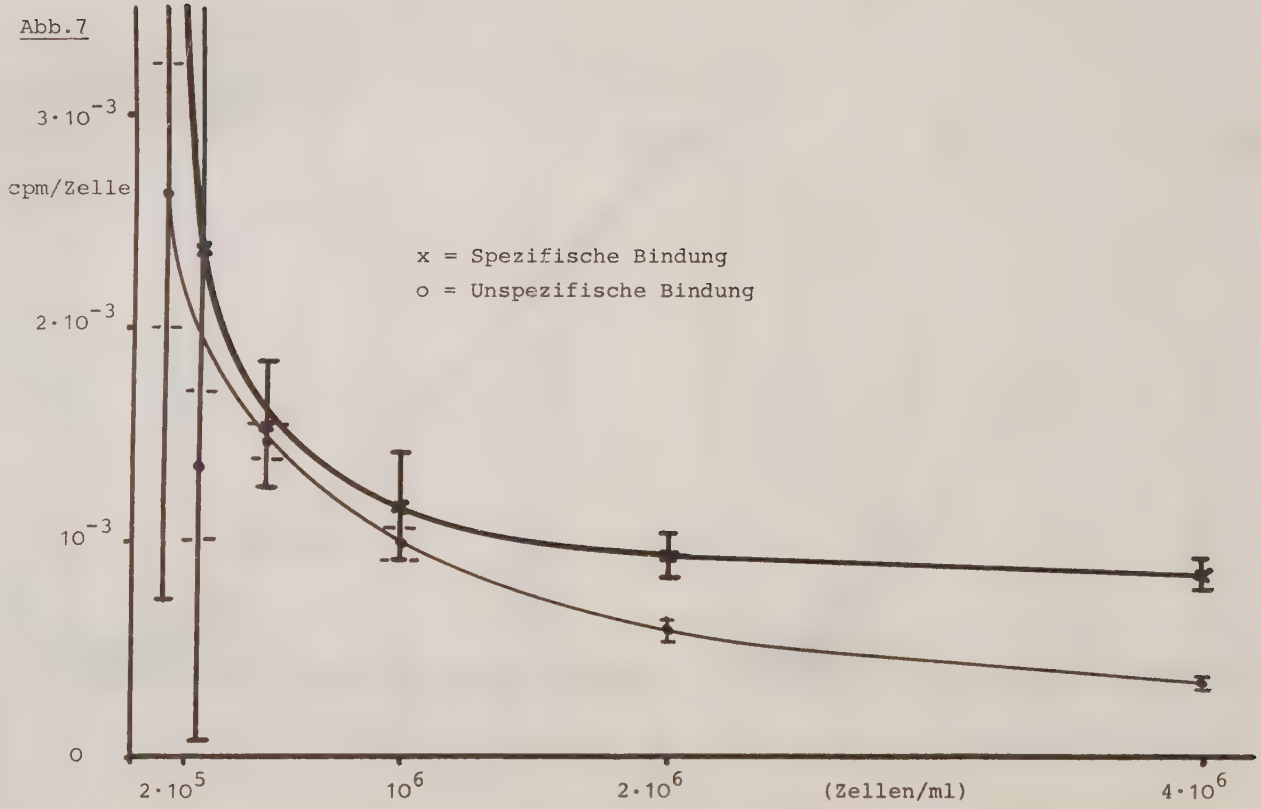

1,0
%
der zugegebenen Gesamt-
aktivität
0,8
0,6
0,4
0,2
0
x = Spezifische Bindung
o = Unspezifische Bindung
2·10^5
10^6
2·10^6 (Zellen/ml)
4·10^6

Abb.7


3·10⁻³
cpm/Zelle
2·10⁻³
10⁻³
0
x = Spezifische Bindung
o = Unspezifische Bindung
2·10⁵
10⁶
2·10⁶
(Zellen/ml)
4·10⁶

2.3. ^{125}J-Insulinkonzentration

Die Hormon-Rezeptorbindung ist in ihrer Quantität abhängig sowohl von der Rezeptorkonzentration als auch von der Hormonkonzentration. Der Einfluß der Rezeptorkonzentration - in Form der Fettzelldichte - wurde bereits im vorigen Abschnitt untersucht; hier soll nun die Bindung von ^{125}J-Insulin an Fettzellen in Abhängigkeit von der Radiojodkonzentration näher geprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden zwei voneinander unabhängige Meßreihen angesetzt, von denen die eine einen Bereich niedriger Hormonkonzentrationen von 29,9 bis 89,7 pMol/l umfaßte, während die andere hohe Konzentrationen von 54,5 bis 571 pMol/l abdeckte. Diese beiden Reihen wurden eingeplant, um die Theorie von mehreren - mindestens zwei - voneinander unabhängigen Rezeptorklassen verschiedener Affinität und Konzentration (16.-19.) für dieses Testsystem abzuklären. Der niedrige Konzentrationsbereich müßte die hochaffinen Rezeptormoleküle erfassen, der hohe Bereich auch die weniger affinen.

Bei nur einem Rezeptortyp wäre in der graphischen Auftragung eine einfach hyperbole Sättigungskurve mit asymptotischer Annäherung an einen Maximalwert zu erwarten, bei zwei in der beschriebenen Art voneinander verschiedenen Rezeptoren sollte die Kurve zwar hyperbolisch beginnen, dann aber in flacher Hyperbel einem viel höheren Maximum zulaufen (40.).

In der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver u. Burke sollten in diesem Falle die Punkte des niederen Konzentrationsbereiches - jede für sich extrapoliert - zu zwei verschiedenen Dissoziationskonstanten K_d führen (40.).

Abb.8 und Abb.9 zeigen, daß es sich in diesem Fall um mindestens zwei Rezeptortypen handeln muß; denn die anfangs steil ansteigende Hyperbel geht nicht in eine Asymptote über sondern verläßt den Meßbereich - der durch die ^{125}J-Insulinpräparation nach oben begrenzt ist - noch immer relativ steil. Die in Abb.8a und Abb.9a dargestellten doppelt reziproken Diagramme zeigen dann auch - je nach Meßbereich - zwei verschiedene Dissoziationskonstanten.

Jedoch sollten die Zahlenwerte derselben von 209 bzw. 625 pMol/l nur qualitativ verstanden sein, da zu einer exakten

Bestimmung dieser Werte viel mehr Meßpunkte, genauer kalibrierte ^{125}J-Insulinpräparationen und Fettzellpräparationen erforderlich gewesen wären. Außerdem müßten die gegenseitigen Anteile beider Bereiche quantitativ berücksichtigt werden. Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang darauf, daß auch die in der Literatur angegebenen Konstanten von Autor zu Autor stark differieren, daß also die Ergebnisse sehr stark von einzelnen Bedingungen abhängig sind.

Wichtigste und eindeutige Aussage dieser beiden Kurven ist, daß es zwei deutlich voreinander verschiedene Dissoziationskonstanten gibt, daß es also mindestens zwei Rezeptortypen geben muß, von denen der eine mit einer hohen Affinität zum Insulin in relativ niedriger Konzentration (ca.16 pMol/l) und der mit niedriger Affinität in höherer Konzentration (ca. 45 pMol/l) vorliegt.

Für die Praxis hat das als Konsequenz, daß die Versuche im niedrigeren Konzentrationsbereich durchgeführt werden müssen, da ein Parameter für spezifische Insulinaktivität gefunden werden soll; die höchste spezifische Wechselwirkung ist bei dem hochaffinen Rezeptor anzunehmen, Wechselwirkungen mit dem weniger affinen Rezeptortyp können höchstens zu Meßfehlern führen.

Als Mittelweg zwischen einer möglichst hohen Hormonkonzentration, um durch möglichst hohe Besetzung der hochaffinen Rezeptoren eine maximale Spreizung zu erzielen, und einer niedrigen, bei der die Bindung an niederaffine Rezeptoren noch vernachlässigbar ist, wurde für die weiteren Versuche eine Konzentration um 80 pMol ^{125}J-Insulin pro Liter gewählt.

Abb.8

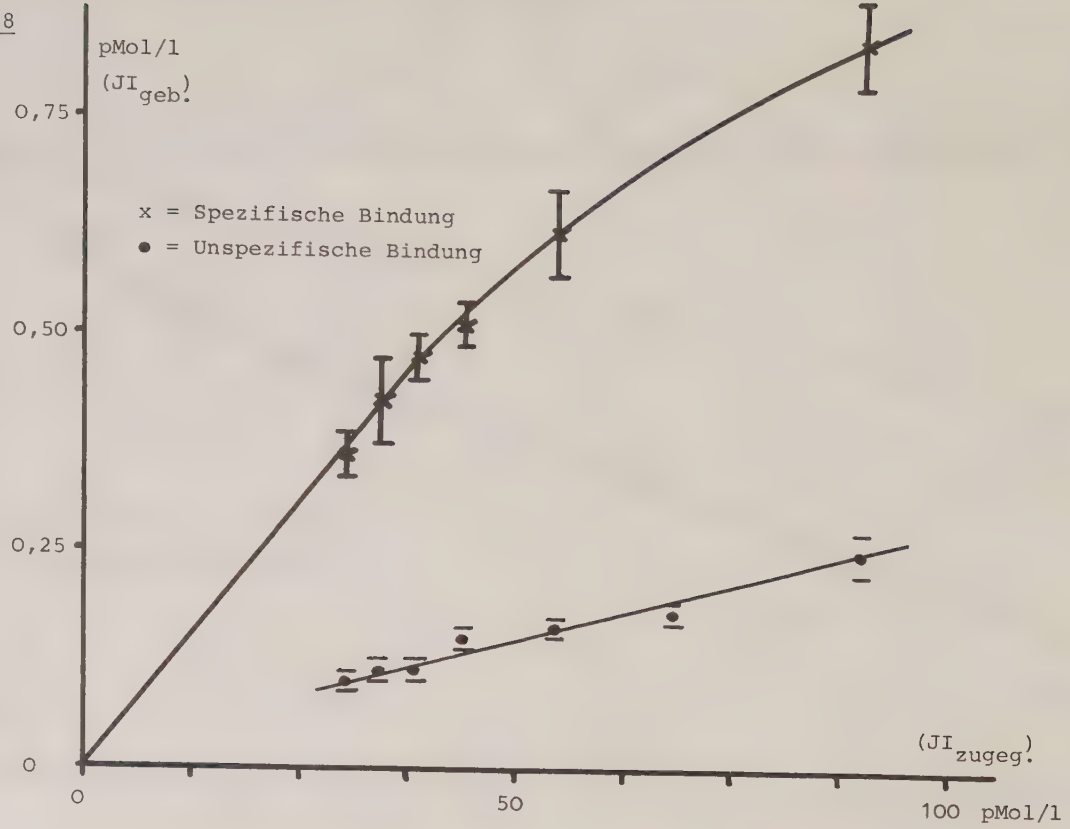

pMol/l
(JI geb.)
0,75
0,50
0,25
0
x = Spezifische Bindung
● = Unspezifische Bindung
(JI zugeg.)
0
50
100 pMol/l

Abb.9

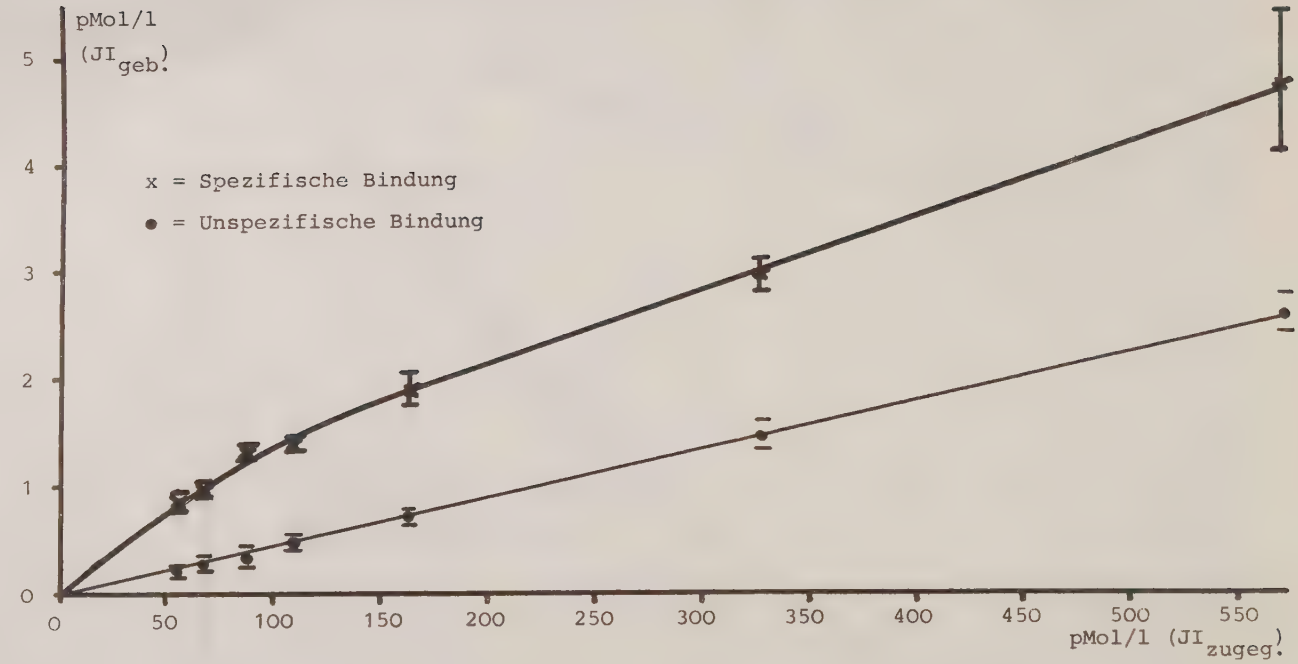

pMol/l
(JI geb.)
x = Spezifische Bindung
● = Unspezifische Bindung
0
1
2
3
4
5
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
pMol/l (JI zugeg.)

Abb.9a

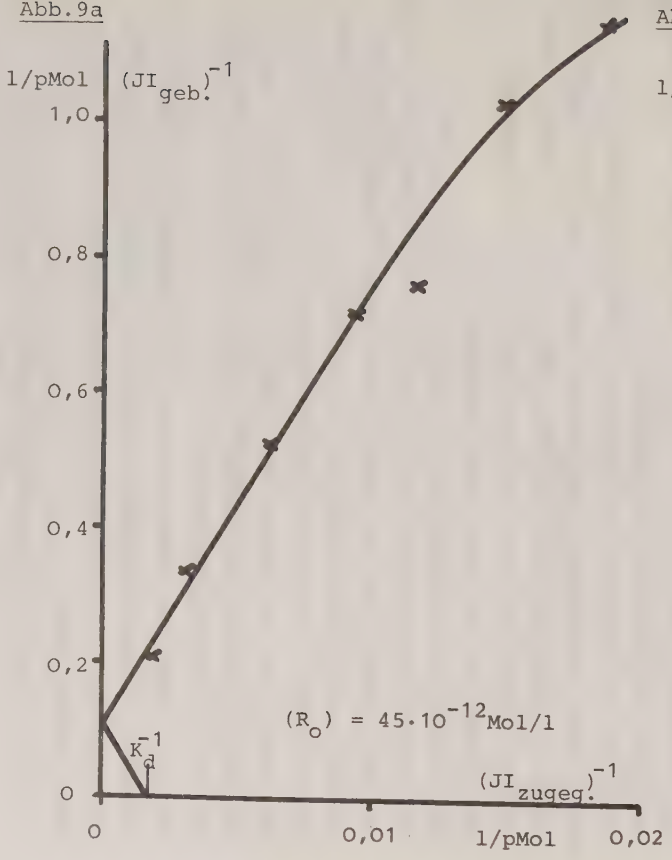
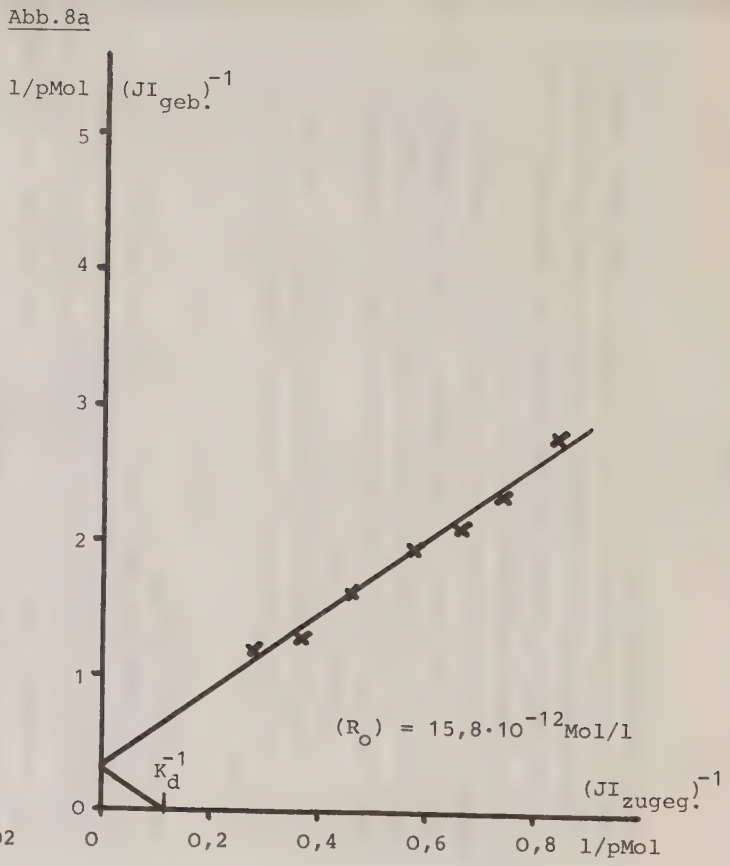

1/pMol
$(JI_{geb.})^{-1}$
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
K_d^{-1}
$(R_o) = 45 \cdot 10^{-12}$ Mol/l
$(JI_{zugeg.})^{-1}$
0
0,01
1/pMol
0,02

Abb.8a


1/pMol
$(JI_{geb.})^{-1}$
5
4
3
2
1
0
K_d^{-1}
$(R_o) = 15,8 \cdot 10^{-12}$ Mol/l
$(JI_{zugeg.})^{-1}$
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1/pMol

2.4. Einfluß des Puffers

Jedes biologische System, ob Zelle, Organ oder Organismus, ist abhängig vom umgebenden Medium. Sowohl das reine Überleben als auch Art und Stärke der Reaktionen auf Umwelteinflüsse sind an dieses gebunden.
Daher ist es von besonderer Wichtigkeit für Experimente mit lebenden Zellen, daß man den Puffer, in dem man diese Versuche durchführt, optimiert hat oder zumindest über die Einflüsse von Puffertyp, pH oder Nährstoffgehalt auf die gemessenen Effekte informiert ist.
Unter diesem Gesichtspunkt wurden die genannten Faktoren überprüft und die Ergebnisse in den folgenden Abschnitten dargestellt.

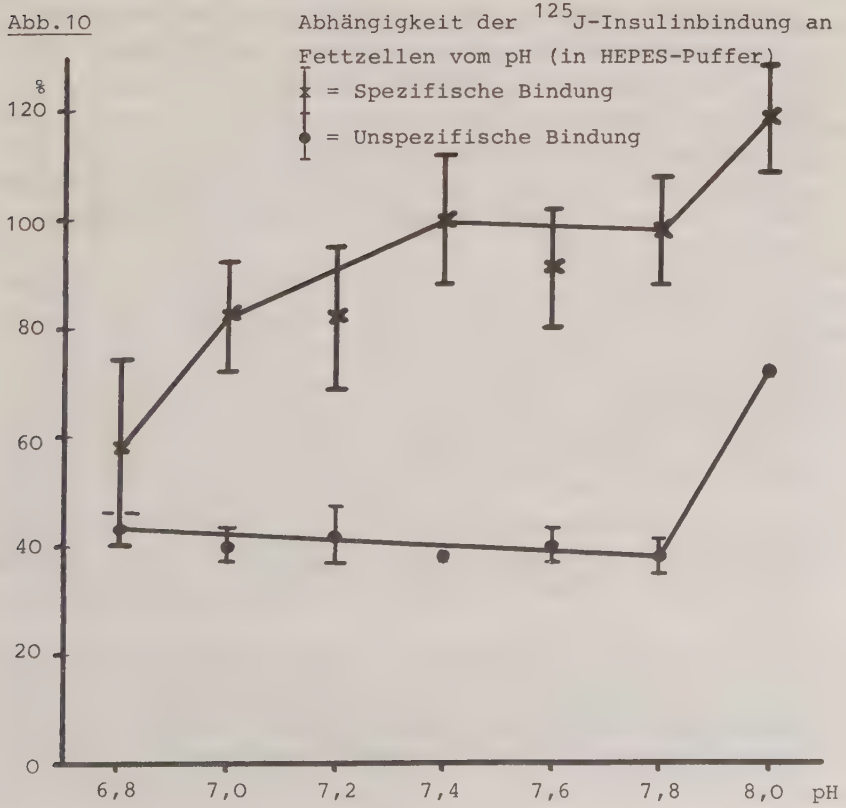
2.4.1. Einfluß des pH

Verwendet wurde ein HEPES-Puffer, mit dem das Gebiet von pH 6,8 bis pH 8,0 in 0,2 pH-Einheitsschritten untersucht wurde. In parallelen Ansätzen wurden die spezifische und die unspezifische Bindung von ^{125}J-Insulin an die Zellen bestimmt und in Abb.10 und Tab.7 dargestellt.
Es zeigt sich, daß die unspezifische Bindung unterhalb von pH 7,8 als pH-unabhängig betrachtet werden kann, aber oberhalb dieses pH einen steilen Anstieg erfährt. Bei pH 8 dürfte wohl die Zellmembran so stark verändert werden, daß Außenmedium ungehindert in die Zelle eindringen kann.
Die spezifische Bindung nimmt von pH 6,8 bis pH 7,4 zu, bleibt etwa konstant bis pH 7,8 und zeigt dann ebenfalls einen starken Anstieg, was sich möglicherweise auf zusätzliche Rezeptoren zurückführen läßt, die durch die bislang unklare Membranveränderung zugänglich werden könnten (49.).
Die Kurve läßt ein Arbeiten bei einem pH zwischen 7,4 und 7,8 als vorteilhaft erscheinen. Folgende Versuche werden deshalb bei pH 7,4 durchgeführt.
Auch in diesem Experiment wurden die Ergebnisse der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wegen in %-Einheiten angegeben, wobei der Wert der Bindung beim physiologischen pH 7,4 als 100% gesetzt wurde.

Tab.7

pH	Spezifische Bindung %	n	Unspezifische Bindung %	n
6,8	58 ± 16	5	43 ± 3	5
7,0	82 ± 10	5	40 ± 3	5
7,2	82 ± 13	5	42 ± 5	5
7,4	100 ± 12	5	38 ± 1	5
7,6	91 ± 11	5	40 ± 3	5
7,8	98 ± 10	5	38 ± 3	5
8,0	119 ± 10	5	72 ± 1	5

Abb.10



2.4.2. Einfluß des Puffertyps auf die Überlebensrate der Fettzellen

Für Versuche mit biologischen Systemen stehen eine ganze Anzahl von Puffern mit pH-Optimum im physiologischen Bereich zur Verfügung. Die bekanntesten und häufigst verwendeten sind:

Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Glycylglycin (Gly-Gly)
3-(N-morpholino)propansulfonsäure (MOPS)
N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)

Über eine Toxizität oder andere Wirkung dieser Puffer auf Fettzellen bzw. deren Insulinrezeptoren gibt es in der Literatur bisher keine näheren Untersuchungen. Deshalb war es wünschenswert zu prüfen, ob die organischen Puffersysteme irgendwelche Vorteile oder Nachteile gegenüber dem bisher traditionell verwendeten, von Gliemann und Gammeltoft (41.) für die Fettzelltests eingeführten KRB-System bieten.
Zu diesem Zweck wurde zuerst einmal die Überlebensrate von Fettzellen in den betreffenden Puffern bestimmt, indem die Zellen im fertigen Testansatz vor der 35-minütigen Inkubation mit ^{125}J-Insulin zuerst einmal zwischen 5 und 65 Minuten präinkubiert wurden.
Dabei absterbende Zellen lysieren,und die Membranen lassen sich nicht mehr durch Dinonylphthalat vom wäßrigen Medium abtrennen, wobei die zellgebundene Rezeptorzahl und damit die gebundene Radioaktivität im gleichen Maße abnimmt.
Häufig beobachtet man während der Zell-Lyse auch ein Ansteigen der unspezifischen Bindung, was durch ein Einschließen von Radioaktivität in freigesetzte Triglyceride bewirkt wird. Dieser Effekt ist auch als Marker für eine mißglückte Fettzellpräparation zu gebrauchen, falls etwa der Zellwaschpuffer hypotonisch war oder Überwärmung der Collagenaselösung eintrat.
Die Puffer waren zwecks besserer Vergleichbarkeit analog zu KRB-Puffer angesetzt, nur daß statt Bicarbonatlösung eine Lösung der entsprechenden Puffersubstanz zugegeben wurde, so daß die Endkonzentration an Puffer 0,025 Mol/l betrug.

Um hypotonische Effekte zu vermeiden, wurde die Plasmolyse von Rattenerythrocyten im zehnfachen Volumen Puffer beobachtet (visuelle Beurteilung) und die Kochsalzkonzentration bis zum Ausbleiben dieser Reaktion erhöht. Bei allen organischen Puffersystemen erwies sich ein Gehalt von 0,5% NaCl in der 0,154 molaren Pufferstammlösung als ausreichend.
Von der Waschung nach der Collagenasebehandlung bis zum Test kommen die Zellen nur mit dem jeweils eingesetzten Puffer in Berührung. Dabei ist es wichtig, daß genau reproduzierbar gearbeitet wird, damit nicht die Präinkubationszeiten verfälscht werden.
Die experimentell erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbn.11a-d dargestellt, einige spezielle Faktoren werden in den Abbn.12a-e direkt verglichen.
Will man die Ergebnisse werten, so fällt der Tris-Puffer sofort aus der engeren Wahl, da die Messungen in diesem Puffer die größte mittlere Standardabweichung von allen untersuchten Puffern haben (spricht für starke Zellaggregation), da die Abnahmen nach 35 und 65 Minuten die größten überhaupt sind und - dieses Argument allein würde den Tris-Puffer schon ausscheiden - die mittlere unspezifische Bindung fast 30% über der maximalen spezifischen Bindung liegt.
Bei den übrigen Puffersystemen fällt die Werteung viel schwerer. Zwar zeigt der KRB-Puffer besonders in der Zeit zwischen 35 und 65 Minuten ein starkes Abfallen der Bindung - wohl aufgrund der Erschöpfung der Pufferkapazität -,doch dafür liegen die Werte der unspezifischen Bindung und der mittleren Standardabweichung sehr gut und bei der mittleren Streuung der Meßpunkte um die Ausgleichskurve sogar eine Größenordnung niedriger als bei den übrigen.
Gly-Gly- und HEPES-Puffer zeigen keinerlei und MOPS-Puffer eine nur geringfügige Bindungsabnahme bei nicht übermäßiger unspezifischer Bindung.
Doch zeigen unerfreulich hohe Werte bei der mittleren Standardabweichung der spezifischen Bindung und bei der mittleren Streuung der Meßpunkte um die - nur schwer zu ermittelnde Ausgleichskurve, daß unter dem Einfluß dieser Puffer eine Aggregation der Fettzellen eintritt.

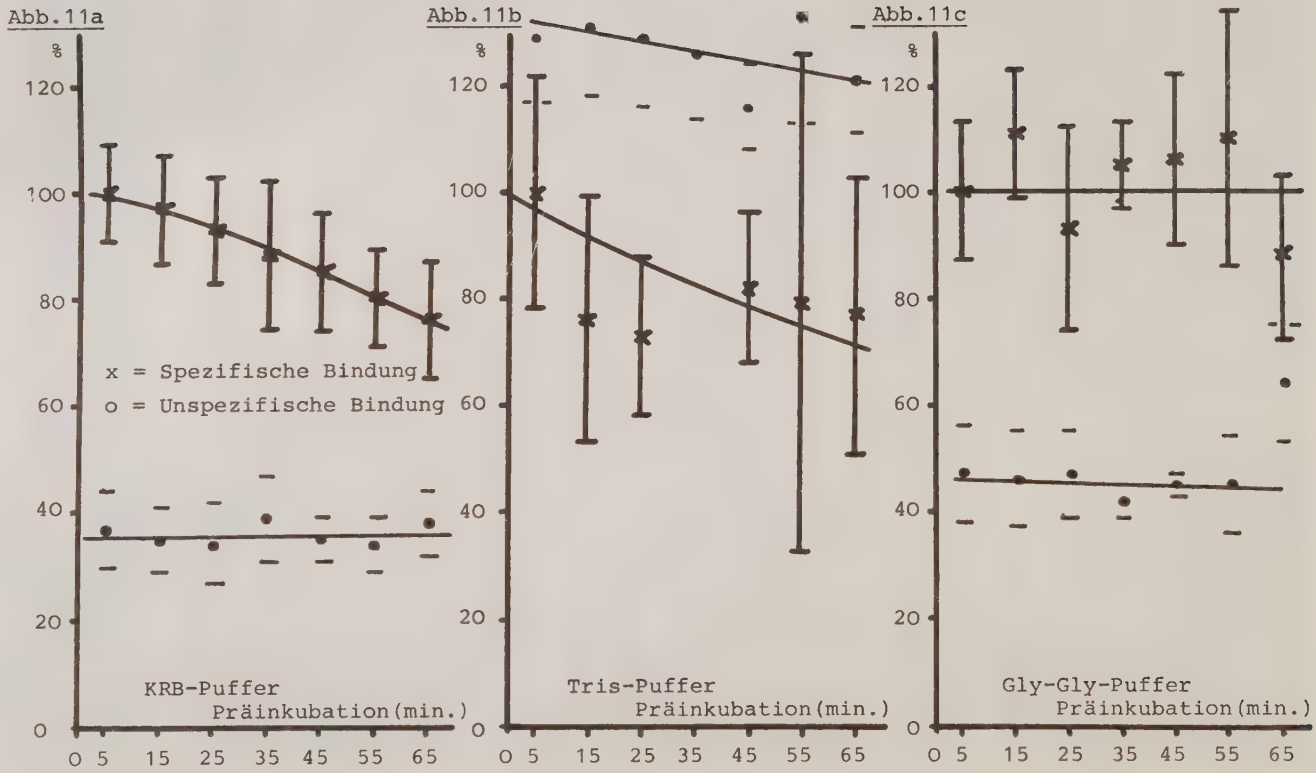


Abb.11a
%
120
100
80
60
40
20
0
x = Spezifische Bindung
o = Unspezifische Bindung
KRB-Puffer
Präinkubation(min.)
0 5 15 25 35 45 55 65
Abb.11b
%
120
100
80
60
40
20
0
Tris-Puffer
Präinkubation(min.)
0 5 15 25 35 45 55 65
Abb.11c
%
120
100
80
60
40
20
0
Gly-Gly-Puffer
Präinkubation(min.)
0 5 15 25 35 45 55 65

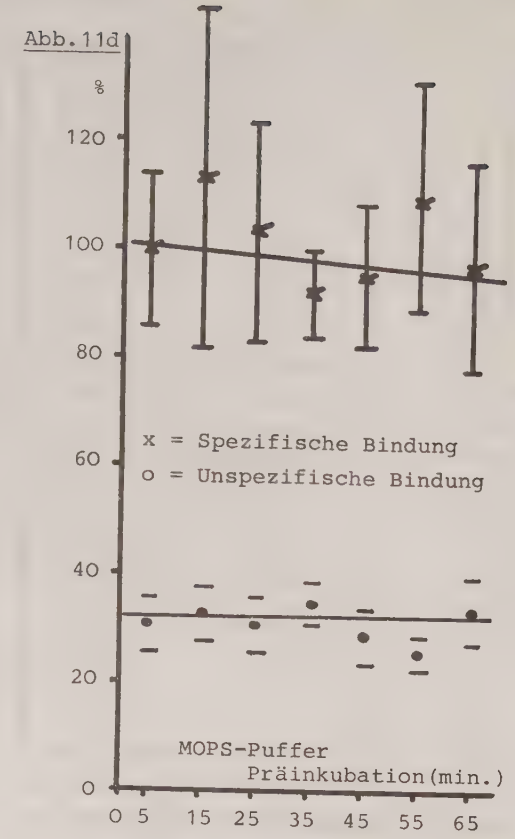


Abb.11d
%
120
100
80
60
40
20
0
x = Spezifische Bindung
o = Unspezifische Bindung
MOPS-Puffer
Präinkubation(min.)
0 5 15 25 35 45 55 65

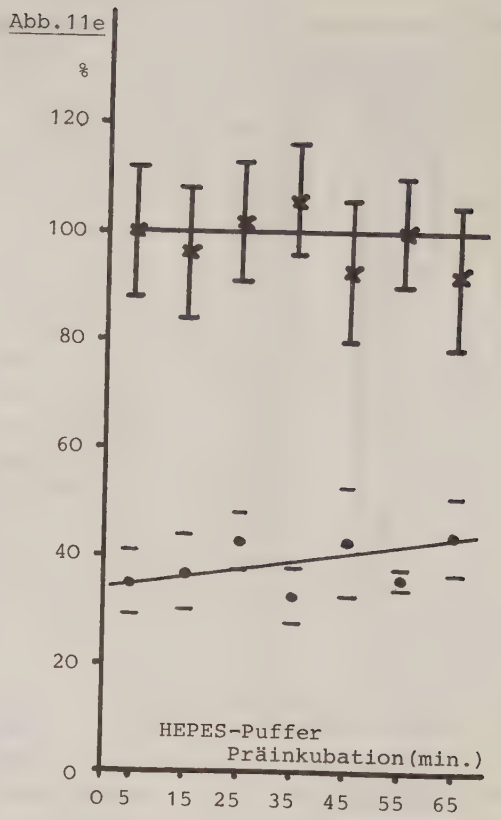


Abb.11e
%
120
100
80
60
40
20
0
HEPES-Puffer
Präinkubation(min.)
0 5 15 25 35 45 55 65

Abb.12a Mittlere Standardabweichungen der Spezifischen Bindung als % der maximalen Spezifischen Bindung

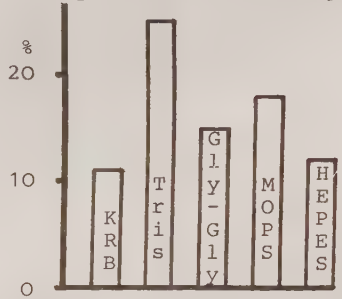


Abb.12b Abnahme der Spezifischen Bindung nach 35 min. als % der maximalen Spezifischen Bindung

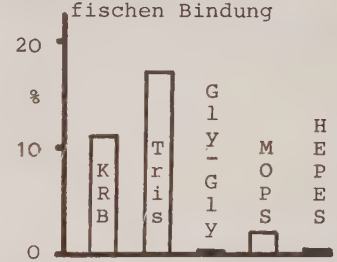


Abb.12c Abnahme der Spezifischen Bindung nach 65 min. als % der maximalen Spezifischen Bindung

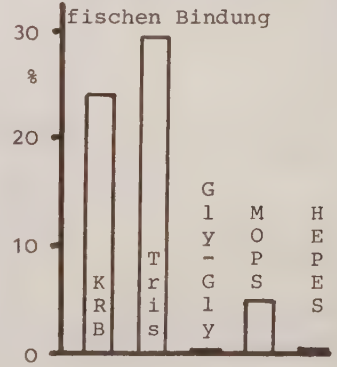


Abb.12d Mittlere Unspezifische Bindung als % der maximalen Spezifischen Bindung

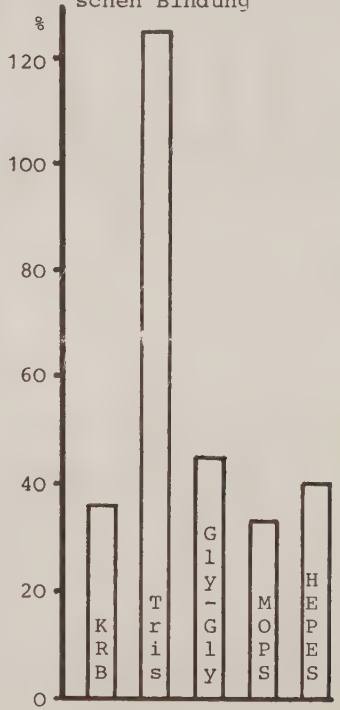
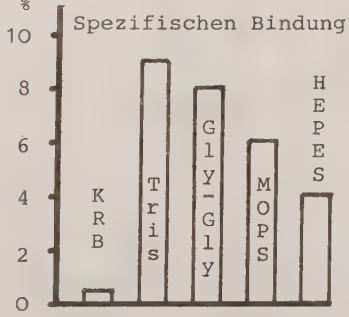


Abb.12e Mittlere Streuung der Meßpunkte um die Ausgleichskurve als % der maximalen Spezifischen Bindung



Diese Aggregation ist makroskopisch sichtbar und führt zu hohen Fehlern beim Pipettieren der nicht mehr homogenen Suspension; in KRB-Puffer ist sie nicht zu beobachten. Die Tendenz spricht zwar für letzteren Puffer, doch soll ein abschließendes Urteil erst nach dem nächsten Abschnitt gefällt werden, in dem Sättigungskurven mit ^{125}J-Insulin in den verschiedenen Puffern untersucht werden.

2.4.3. Einfluß des verwendeten Puffers auf die ^{125}J-Insulinbindung bei verschiedenen ^{125}J-Insulinkonzentrationen

Bei diesem direkten Vergleich der Bindungseigenschaften kam es auf eine hohe Übereinstimmung in der Qualität der Fettzellpräparationen an. Dies wurde angestrebt durch genau gleiche Einwaagen von Fettgewebe gleichschwerer Tiere und besonders genaues Einhalten aller anderen Faktoren wie Zeiten, Temperatur und Verdünnungen.

Die gemessenen Werte wurden zuerst zur besseren Übersicht einmal in der einfachen Auftragung "Radiojodinsulin gebunden" gegen "Radiojodinsulin zugegeben" dargestellt (Abb.13a und b). Schon diese Darstellungen zeigen, daß bei jeder Konzentration der KRB-Puffer die höchste Bindung liefert. Am schlechtesten schneidet dagegen auch hier der Tris-Puffer ab.

Um die Aussagen auch quantitativ auswerten zu können, wurden die Kurven in die doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver und Burke übertragen. Dabei liefert der Ordinatenabschnitt die reziproke Rezeptorkonzentration R_o und der Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der Abszisse die negative reziproke Dissoziationskonstante K_d (Abbn.14a - e).

Wegen der starken Streuung der Punkte wurde die lineare Regression mittels eines elektronischen Rechners SR-51A der Firma Texas Instruments angewendet.

Zum besseren Vergleich wurden in Abb.15a die aus diesen Kurven entnommenen Dissoziationskonstanten nebeneinander dargestellt. Die Werte von KRB-, Tris-, Gly-Gly- und MOPS-Puffer liegen im gleichen Bereich, so daß man im Rahmen der Meßgenauigkeit von identischen Werten ausgehen muß. Lediglich der HEPES-Puffer weicht sehr stark nach oben ab. Das bedeutet, daß dieser Puffer durch irgendwelche Wechselwirkungen mit dem Insulinrezeptor

oder der Zellmembran die Spezifität der Insulin-Rezeptor-Bindung senkt.
Dieser Eingriff in das Meßsystem macht den HEPES-Puffer untauglich für die beabsichtigten Experimente.
In Abb. 15b sind die aus den doppelt reziproken Graphiken entnommenen Rezeptorkonzentrationen vergleichend nebeneinander gestellt. Dabei zeigt sich, trotz näherungsweise gleicher Zelldichte (ausgehend vom Fettgewebe), ein großer Unterschied zwischen den Puffern. "KRB-Puffer" weist bei weitem die größte Rezeptordichte auf, dicht gefolgt von "HEPES-Puffer" und weit dahinter die restlichen.
In Abschnitt 2.4.2. wurde schon gezeigt, daß Tris-Puffer eine toxische Wirkung auf Fettzellen ausübt, was hier das Absinken der Rezeptorkonzentration bewirken könnte.
Doch Gly-Gly-Puffer und MOPS-Puffer hatten keinerlei Toxizität gezeigt, weshalb es sich hier wohl nur um eine scheinbare Rezeptorreduzierung wegen nichtkompetitiver Hemmeffekte handeln kann (40.). Diese Hemmeffekte scheiden die hemmenden Puffersubstanzen aus der näheren Wahl. HEPES-Puffer scheint, gemessen an der scheinbaren Rezeptorkonzentration, keine derartige Hemmung auszuüben.
In Tab.8 sind noch einmal alle Effekte der untersuchten Puffer zusammengefaßt.
Bemerkenswert ist dabei, daß der KRB-Puffer trotz seiner Bindungsverluste mit der Zeit ("Toxizität") der einzige verwendbare Puffer ist, da er keine feststellbaren Wechselwirkungen mit dem Rezeptor eingeht. Daher werden alle folgenden Bindungs- bzw. Verdrängungstests in KRB-Puffer mit einer maximalen Präinkubation von 35 Minuten durchgeführt.

Abb.13a

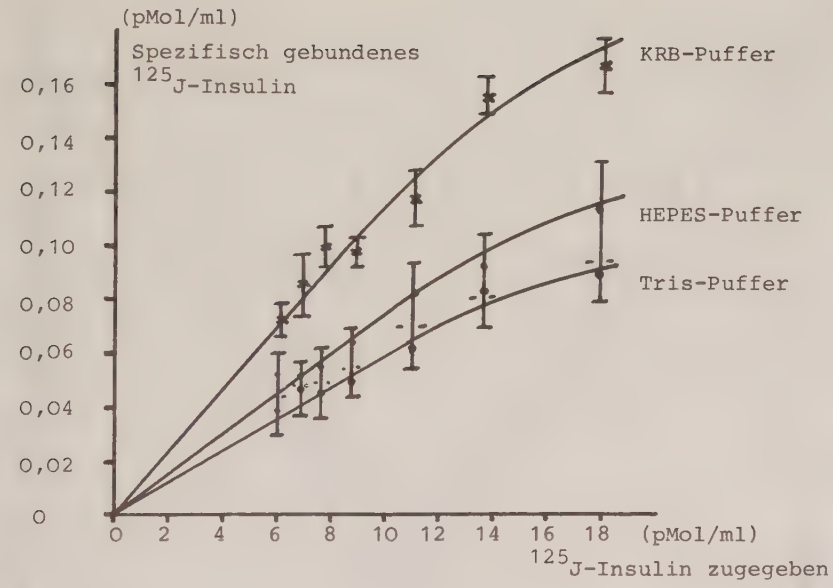


Abb.13b

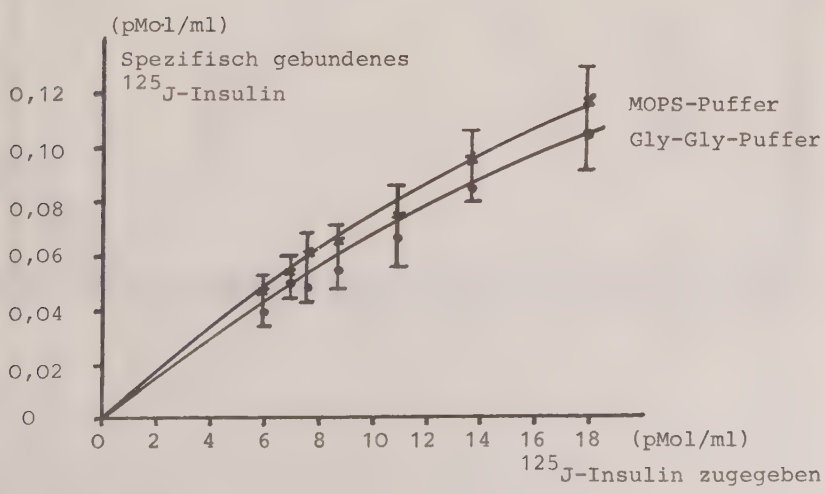


Abb.14a

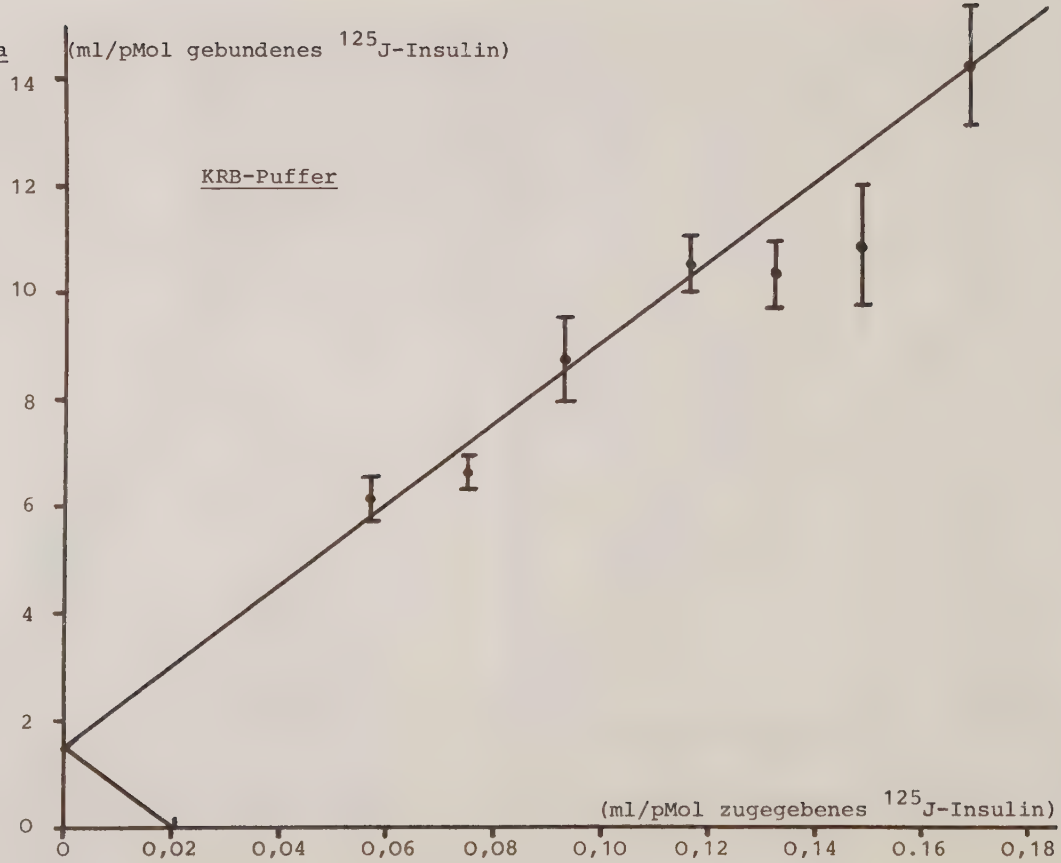

(ml/pMol gebundenes ^{125}J-Insulin)
14
12
10
8
6
4
2
0
KRB-Puffer
(ml/pMol zugegebenes ^{125}J-Insulin)
0
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
0,12
0,14
0.16
0,18

Abb.14b

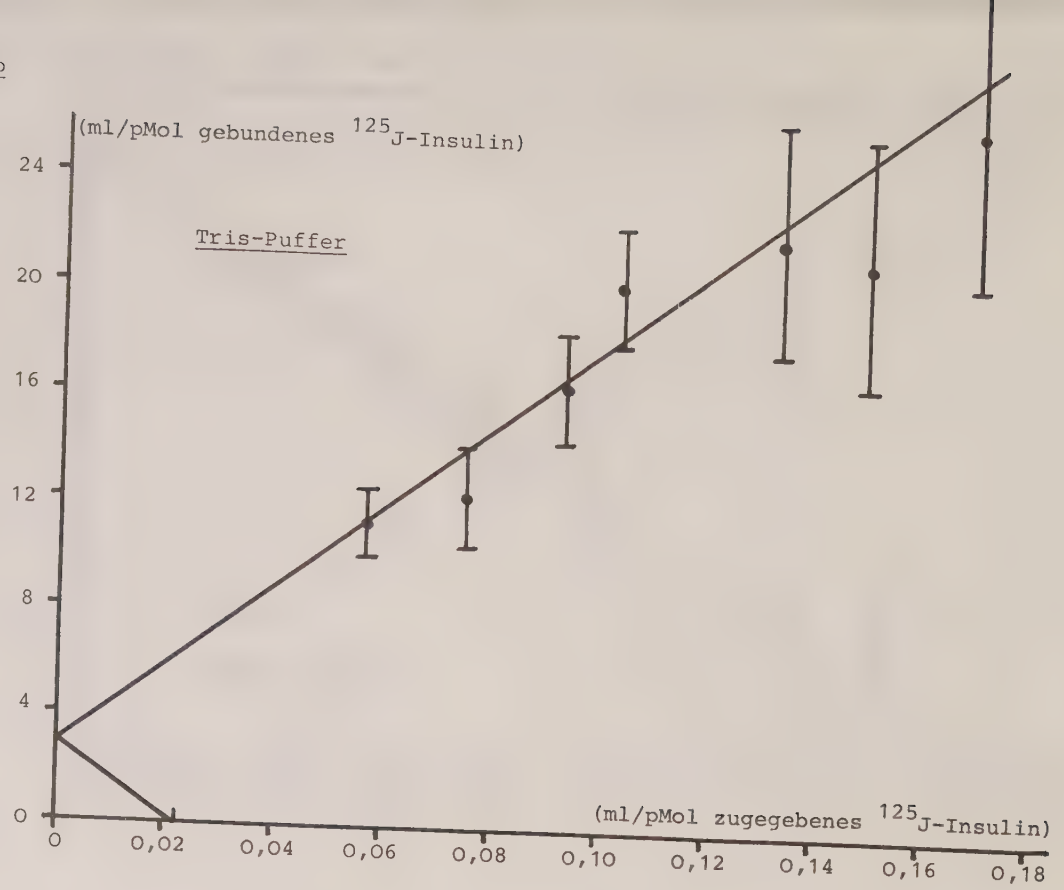

(ml/pMol gebundenes ^{125}J-Insulin)
Tris-Puffer
24
20
16
12
8
4
0
0
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
0,12
0,14
0,16
0,18
(ml/pMol zugegebenes ^{125}J-Insulin)

Abb.14c

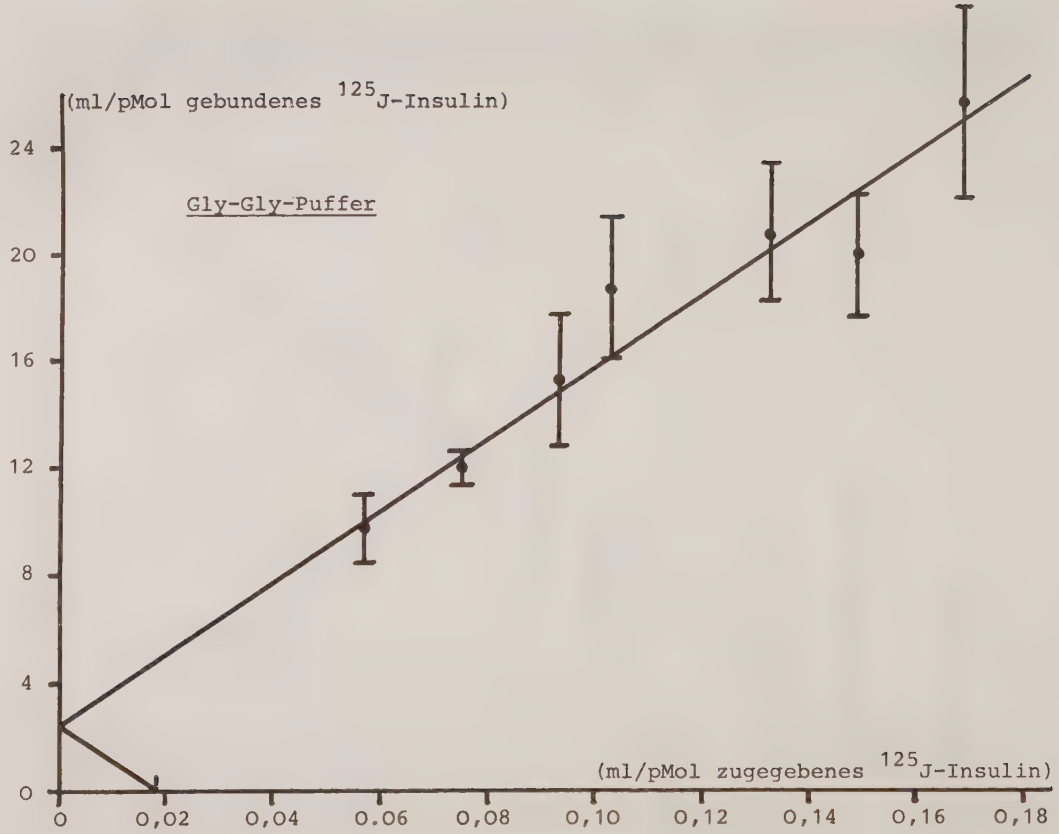

(ml/pMol gebundenes ^{125}J-Insulin)
Gly-Gly-Puffer
24
20
16
12
8
4
0
(ml/pMol zugegebenes ^{125}J-Insulin)
0
0,02
0,04
0.06
0,08
0,10
0,12
0,14
0,16
0,18

Abb.14d

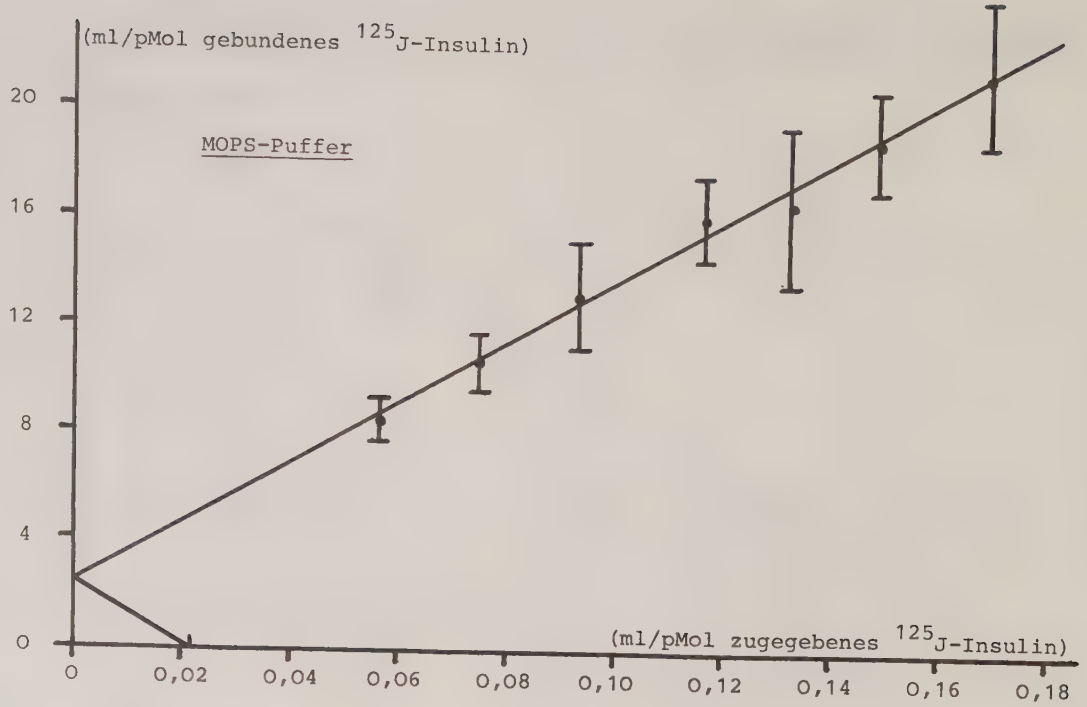

(ml/pMol gebundenes ^{125}J-Insulin)
MOPS-Puffer
20
16
12
8
4
0
(ml/pMol zugegebenes ^{125}J-Insulin)
0
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
0,12
0,14
0,16
0,18

Abb.14e

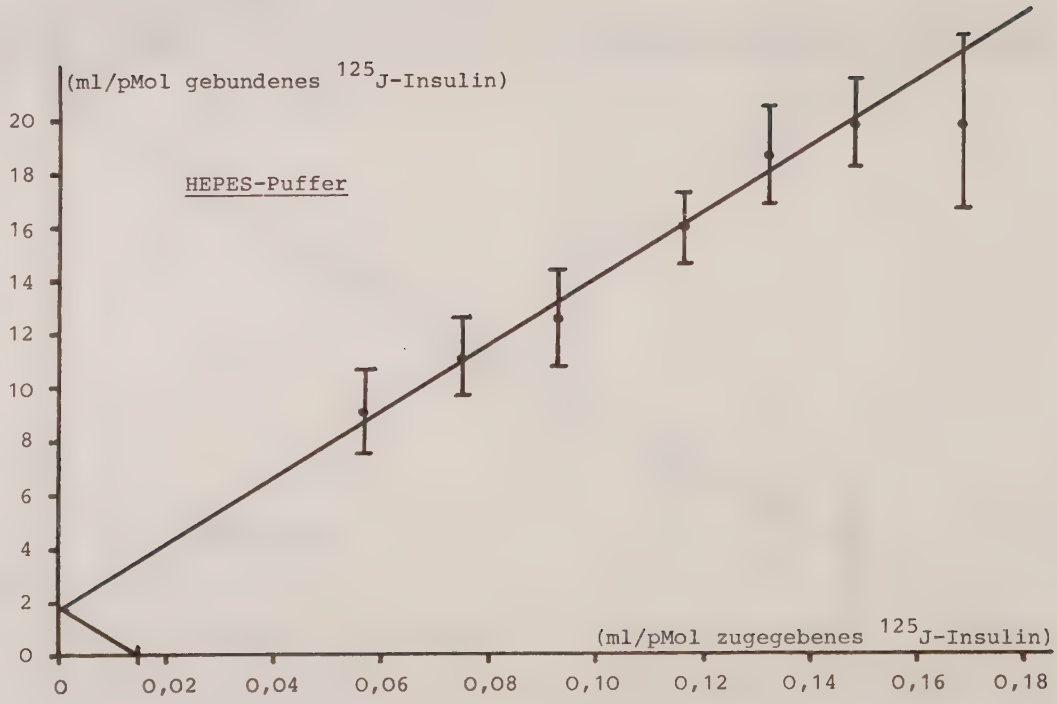
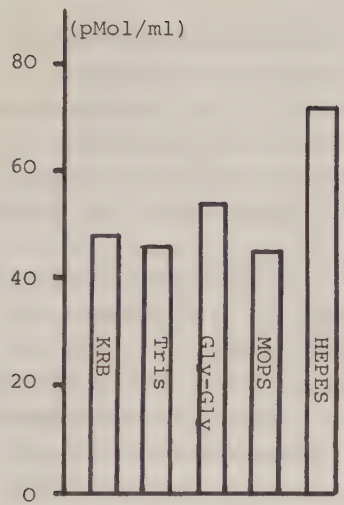
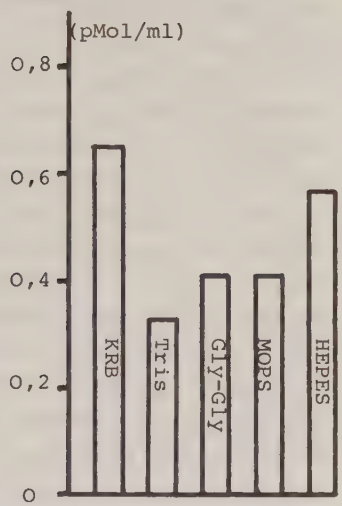

(ml/pMol gebundenes ^{125}J-Insulin)
HEPES-Puffer
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
(ml/pMol zugegebenes ^{125}J-Insulin)
0
0,02
0,04
0,06
0,08
0,10
0,12
0,14
0,16
0,18

Abb.15a



Dissoziationskonstanten K_d in pMol/ml Abhängigkeit vom verwendeten Puffer

Abb.15b



Rezeptorkonzentration R_o in pMol/ml entnommen aus der doppelt reziproken Auftragung

Tab.8

Puffer: / Effekt:	KRB	Tris	Gly-Gly	MOPS	HEPES
Standard-abweichg.	-	++	o	o	-
Streuung	--	++	++	+	o
Unspez. Bindung	-	++	o	-	o
Toxizität	+	++	--	-	--
Spezifität	++	++	+	++	--
Hemmung	--	++	+	+	-

Zeichen: ++ = sehr stark + = stark o = mäßig - = schwach
-- = sehr schwach

2.4.4. Einfluß der Glukosekonzentration auf die Überlebensrate von Fettzellen

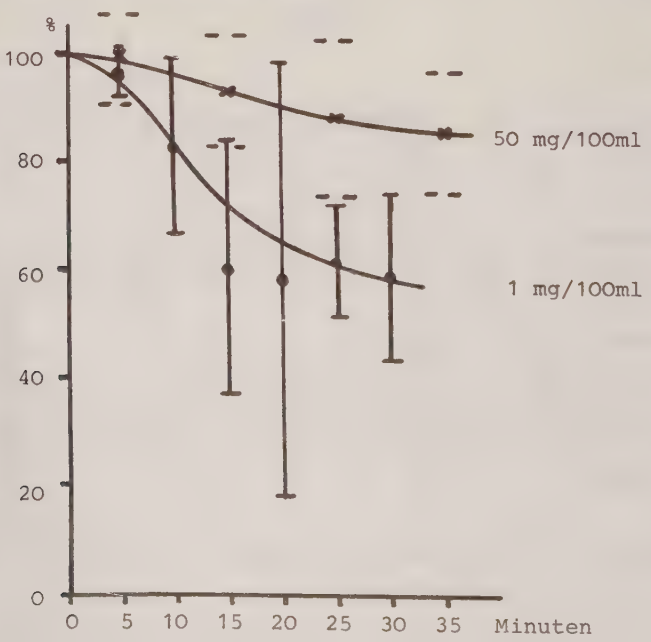
Nach der Ermittlung der optimalen Pufferung des Testmediums ist zu überlegen, welche weiteren Zusätze zu der Testlösung essentiell sind. Unumstritten ist dabei in der Literatur das Serumalbumin als Schutzprotein, eventuell gegen aus der Gewebsdesintegration eingeschleppte Proteasen; hingegen gehen in den Vorschriften die Angaben über einen Zusatz von Glukose und deren Konzentration auseinander.

Daher wurden in zwei Ansätzen die Überlebensraten der Fettzellen in KRB-Puffer gemessen, einmal mit 1 mg Glukose pro 100 ml, einmal mit 50 mg Glukose pro 100 ml.

Untersucht wurde die Überlebensrate in den ersten 35 Minuten. Aus Abb.16 ist ersichtlich, daß die Abnahme insulinbindender Zellen in der Lösung mit geringer Glukosekonzentration mehr als doppelt so groß ist wie in der Lösung mit höherer Glukosekonzentration.

Damit versteht es sich von selbst, daß in künftigen Tests nur Puffer mit einer Glukosekonzentration von mehr als 50 mg/100ml zur Anwendung kommen.

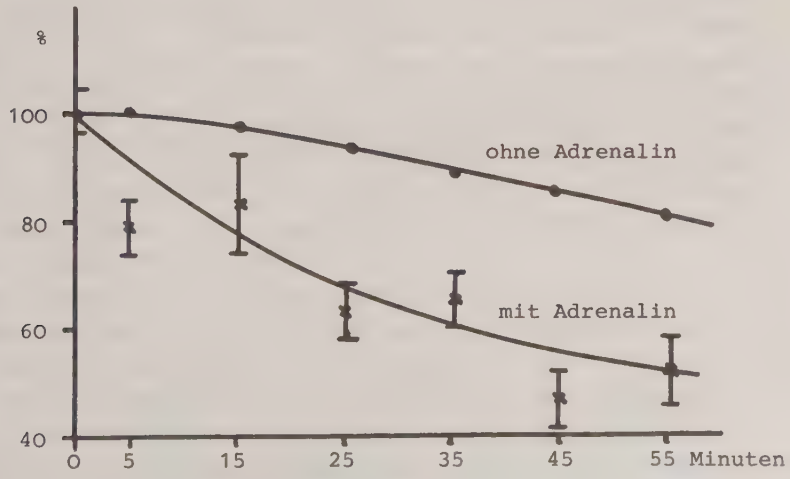
Abb.16



2.5. Einfluß von Adrenalin auf die Überlebensrate

In einigen Insulinexperimenten mit Fettzellen müssen die Zellen zuerst durch Zugabe von Adrenalin in einen "aktivierten Zustand" versetzt werden, so bei der ATP-Messung, der Antilipolyse und der c-AMP-Messung (10., 50., 51.).
Es sollte nun geprüft werden, ob sich ein Zusatz von Adrenalin im Medium positiv auf die Bindung von ^{125}J-Insulin auswirkt, z.B. durch Freisetzung zusätzlicher Rezeptoren.
Da aber Adrenalin gleichzeitig den Adrenalinspiegel senkt und die Lipolyse ankurbelt, ist zu befürchten, daß die Fettzellen bei langer Inkubation Schaden nehmen und die Ausfallrate steigt. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde zuerst eine Meßreihe aufgenommen, in der die ^{125}J-Insulinbindung in Abhängigkeit von der Präinkubationsdauer mit 5,5 µMol/l Adrenalin bestimmt wurde. In Abb.17 ist diese Kurve im Vergleich zu einer ohne Adrenalin eingezeichnet.
Es zeigt sich, daß die Überlebensrate von Fettzellen in Gegenwart von Adrenalin stark verringert wird.
Da Adrenalin also sicher keinen förderlichen Einfluß auf den Insulin-Rezeptor-Bindungstest ausübt, wird eine Adrenalinzugabe zum Testmedium nicht weiter verfolgt.

Abb.17



2.6. Trypsininhibitor

Seit Veröffentlichungen von Kono (52.-55.), Cuatrecasas (56) und Stock (57.) ist bekannt, daß Trypsin die Insulinwirkung an Zellmembranen unterbinden kann und daß sein Angriffsort der Insulinrezeptor ist.

Da das bei der Fettzellpräparation aus Fettgewebe (12.) verwendete Proteasengemisch "Collagenase" (58.) 0,1 U/mg Trypsinaktivität enthält, steht zu befürchten, daß während der einstündigen Gewebsdesintegration bei 37°C eine schwerwiegende Schädigung der Insulinrezeptoren eintritt.

Eine Reinigung des Collagenasegemisches vor der Verwendung kommt nicht in Frage; eine weitere Möglichkeit bietet die spezifische Hemmung des Trypsins, z.B. durch Trypsininhibitor aus Sojabohnen.

Diese setzt aber voraus, daß der Trypsininhibitor keine störenden Wechselwirkungen mit dem Insulinrezeptor eingeht. Daher wurde die Bindung von ^{125}J-Insulin an Fettzellen in Gegenwart verschiedener Trypsininhibitorkonzentrationen gemessen. Unter Berücksichtigung einer wünschenswerten Trypsininhibitormenge von 1 - 2 mg/ml in der Collagenaselösung wurde der Bereich von 0 bis 3 mg/ml in logarithmische Schritten untersucht.

Dabei zeigte sich, daß selbst die höchste Konzentration kein ^{125}J-Insulin vom Rezeptor verdrängt.

Trypsininhibitor aus Sojabohnen verhält sich also gegenüber dem Insulinrezeptor von Fettzellen inert; es bestehen keine Bedenken gegen einen Einsatz dieser Substanz bei der Gewebsdesintegration.

3. Verdrängungstests

Ein Ziel dieser Arbeit soll sein, die Insulinaktivität verschiedener Substanzen bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit dem Insulinrezeptor zu messen. Dazu wurde in den vorangehenden Abschnitten eine Methode optimiert, mit der es möglich ist, in einer Art Isotopenverdünnungstest, wie er schon von Radioimmunoassays her bekannt ist, eine Relation zwischen "Insulinaktivität" im Medium und an Fettzellen gebundener Radioaktivität zu finden.
Dabei wurde der Ausdruck "Insulinaktivität" gewählt, weil nicht die Konzentration sondern das Produkt aus "Insulinähnlichkeit" und Konzentration den direkt meßbaren Parameter darstellt. Der Faktor "Insulinähnlichkeit" besitzt dabei den Status eines Aktivitätskoeffizienten, wie er in der Thermodynamik z.B. bei osmotischen oder Potential-Betrachtungen eine Rolle spielt. Bei Kenntnis der Konzentrationsabhängigkeit dieses Faktors und geeigneter Normierung kann man eine genaue Aussage über die tatsächliche Insulinaktivität einer Substanz gewinnen.
Bevor ich nun zu den quantitativen Überlegungen komme, möchte ich eine kurze Einführung in die dazu benötigte Rezeptortheorie, die zur Versuchsdurchführung nötigen pharmakologischen Erwägungen und die zur Auswertung nötigen mathematischen Hilfsmittel geben.
Die von Ehrlich schon 1900 begründete Rezeptortheorie liefert die Grundlage für vergleichende Betrachtungen der biologischen Wirkung strukturell ähnlicher Moleküle. Sie geht von der Vorstellung aus, daß ein Wirkstoff nur dann einen biologischen Effekt ausüben kann, wenn ein molekularer Reaktionspartner am Wirkort vorhanden ist.
Der Rezeptor stellt einen begrenzten, chemisch reaktiven Bereich an der Zelloberfläche oder in der Zelle dar, der mit komplementären Gruppen eines strukturell spezifischen Wirkstoffes in Wechselwirkung tritt und eine Folge von Ereignissen auslöst, die zu einer biologischen Reaktion führen.
Die Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung ähnelt einer Enzym-Substrat-Wechselwirkung. Der Hormonrezeptor ist ein integraler

Bestandteil der organisierten Zellstruktur. Er stellt das aktive Zentrum eines Biopolymeren dar und ist mit dem aktiven Zentrum eines Enzyms vergleichbar (Zitat nach 59.). Aufgrund der Analogie dieser Interaktionen wurde schon 1926 von Clark (60.) versucht, die enzymatischen Betrachtungen von Michaelis (61.) und Menten (62.) zur quantitativen Beschreibung von Wirkstoff-Rezeptoreffekten heranzuziehen. In den folgenden Jahren wurden die theoretischen Grundlagen noch weiter ausgebaut, und dieser Prozeß ist bis heute noch nicht abgeschlossen.

Der aktuelle Stand der Beschreibung von Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen wird sehr kurz und verständlich in zwei Artikeln, einer von S.Jakobs und P.Cuatrecasas (25.) und einer von P.Cuatrecasas und M.D.Hollenberg (38.), dargestellt.

In Anlehnung an diesen letzten Artikel soll nun die zur Zeit am ehesten anerkannte "Occupancy-Theorie" und ihre Auswirkung bzw. Anwendung auf diese Arbeit dargestellt werden:

Wenn man annimmt, daß die biologische Antwort (Q) der Konzentration des gebildeten Hormon-Rezeptorkomplex(RH) direkt proportional ist, mit maximalem Effekt (Q_{max}) bei Besetzung aller Rezeptoren, kann man auf die Reaktion

$$R + H \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} RH \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \text{Effekt}$$

das Massenwirkungsgesetz anwenden, um den Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Hormons und seiner biologischen Wirkung zu beschreiben.

Im Gleichgewicht ergibt sich die Dissoziationskonstante durch:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{(H)\cdot(R)}{(RH)} \quad .$$

Unter der Annahme, daß der Effekt Q proportional (RH) ist, kann man schreiben $Q = a\cdot(RH)$, wobei a ein Proportionalitätsfaktor ist.

Die maximal mögliche Antwort wäre dann $Q_{max} = a\cdot(R_t)$,mit (R_t) als gesamter Rezeptorkonzentration: $(R_t) = (R) + (RH)$. Durch Einsetzen der Massenwirkungsgleichung und Umformung erhält man daraus $\frac{(RH)}{(R_t)} = \frac{(H)}{K_d + (H)}$

und aus $\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{(RH)}{(R_t)}$ folgt $Q = Q_{max} \cdot \frac{(H)}{K_d + (H)}$.

Diese Gleichung gibt eine hyperbolische Kurve für die Auftragung des Effekts gegen die Hormonkonzentration.
Die Konzentration an freiem Hormon, die für halbmaximalen Effekt nötig ist, $(H)_{0,5}$ kann mit der Dissoziationskonstante gleichgesetzt werden.

$$Q = \frac{Q_{max}}{2} = Q_{max} \cdot \frac{(H)}{K_d + (H)}$$ daraus folgt

$K_d + (H) = 2(H)$ und daraus $K_d = (H)$.

Bei dieser Betrachtung wird eine einfache bimolekulare Reaktion zwischen Hormon und Rezeptor vorausgesetzt.
In der Praxis wird oft ebenso angenommen, daß die Menge gebundenen Hormons vernachlässigbar gering ist, so daß man (H), die Konzentration an freiem Hormon, gleich (H_t), der zugegebenen Hormongesamtkonzentration, setzen kann.
Jedoch ist es wichtig zu bedenken, daß unter gewissen Umständen $(H_t)_{0,5}$, also die Gesamtkonzentration, bei der der Effekt halbmaximal ist (auch ED_{50} genannt), nicht gleich der Dissoziationskonstante sein muß.
Dies ist nur dann gegeben, wenn wirklich nur vernachlässigbare Mengen Hormon gebunden werden. In den hier durchgeführten Versuchen bewegte sich die Menge an gebundenem Hormon stets im Bereich um 1% des zugegebenen, so daß die Vereinfachung wohl erlaubt ist.
Zur Messung von Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen können zwei Faktoren als Indikator dienen: Einmal die Komplexierung (Bindung) des Hormons an den Rezeptor, also die Affinität, zum anderen die Fähigkeit zur Auslösung einer biologischen Reaktion, die oft als "intrinsic activity" oder "efficacy" bezeichnet wird. Während in Glukoseaufnahme-, Glukoseoxidations-, Antilipolyse-,Lipogenese- und Blutzuckertests vorwiegend die "intrinsic activity" bestimmt wird, ist es wichtig, zur Aufklärung des Wirkmechanismus eines Insulinanalogen auch Rezeptorbindungstests durchzuführen.
Rezeptorbindungstests lassen sich nach zwei prinzipiell verschiedenen Methoden durchführen. Einmal kann man den zu untersuchenden Stoff radioaktiv markieren und aus der Dosis-Wirkungs-Kurve seiner Bindung an den Rezeptor direkt, z.B. über die doppelt reziproke Auftragung, die Dissoziationskonstante bestimmen.

Dazu muß aber (bei der Markierung) chemisch in den Stoff eingegriffen werden, ohne daß die Wirkung auf die Affinität und Spezifität des Stoffes bekannt ist. Um z.B. Insulinanaloga im nativen Zustand zu testen, bleibt nur der in der Auswertung schwierigere Weg des Verdrängungstests.
Bei dieser Methode wird die Bindung radioaktiv markierten Rinderinsulins (^{125}J-Insulin) an den Rezeptor in Gegenwart verschiedener Konzentrationen eines nichtmarkierten "Antagonisten", der im Idealfall rein kompetitiv das markierte Hormon konzentrationsabhängig partiell von den Rezeptoren verdrängt.
Da das ^{125}J-Insulin sowohl in seiner Herstellung als auch seiner Dissoziationskonstante gut charakterisierbar ist, bieten sich von der praktischen Durchführung her kaum noch Probleme.
Schwierig ist nur noch die Auswertung: Eine Auswertung analog der kompetitiven Enzymhemmung liegt nahe, z.B. nach Dixon (39.) aus der reziproken Hemmgleichung (auf Rezeptor umgeformt): (JI = ^{125}J-Insulin)

$$\frac{1}{(JI_{geb})} = \frac{1}{(R_t)} \cdot \left(1 + \frac{K_d}{(JI)}\right) + \frac{K_d \cdot (A)}{K_i \cdot (R_t) \cdot (JI)}$$

(R_t) = Gesamtrezeptorkonzentration
(A) = Antagonistenkonzentration
K_d = Dissoziationskonstante von JI
K_i = "Inhibitorkonstante" (scheinbare K_d des Antagonisten).
Hat man aus der Bindung in Abwesenheit des Antagonisten die Gesamtrezeptorzahl (R_t) nach der Beziehung

$$(R_t) = \frac{(JI_{geb.})}{(JI)} \cdot (K_d + (JI))$$

errechnet, liefert die Steigung der Kurve im Dixon-Diagramm $\frac{1}{(JI_{geb.})}$ gegen (A) die Inhibitorkonstante nach

$$K_i = \frac{K_d}{(R_t) \cdot (JI)} \cdot \frac{1}{\text{Steigung}} \quad .$$

Leider stehen der Auswertung der Verdrängungstests nach dieser Methode eine Reihe von Schwierigkeiten im Weg: Erstens sind die Gleichungen, nach denen hier verfahren wird, für hyperbolische Sättigungskurven aufgestellt, während es sich bei den resultierenden Kurven des Verdrängungstests um sigmoide

handelt. Zweitens bewirken die Effekte, welche für die sigmoide Form verantwortlich sind, nämlich (pseudo-) kooperative Wechselwirkungen der Rezeptoren (23., 25.) auch einen nichtlinearen Verlauf des Dixon-Diagramms, wodurch die Ablesung der Steigung uneindeutig wird.
Drittens erschwert die Existenz mehrerer Rezeptorklassen eine genaue Bestimmung von K_d, da K_d scheinbar konzentrationsabhängig ist (16., 25.) und dadurch der Fehler in K_i potenziert wird.
Ist man bereit, diesen großen Fehler zu akzeptieren, muß man sich bewußt sein, daß die Aussagen sich nicht quantitativ sondern nur mehr qualitativ verstehen lassen.
Um zu genauen absoluten Werten zu kommen, wäre ein solcher experimenteller und mathematischer Aufwand nötig, wie er in der Regel bei Serientests nicht möglich ist.
Eine andere Methode der Auswertung liefert zwar keine absoluten, jedoch recht brauchbare qualitative (Relativ-) Werte.
Als Bezugspunkt dient natives Rinderinsulin, bzw. dessen ED_{50} in der Dosis-Wirkungskurve bei der Verdrängung von ^{125}J-Insulin.
Wird die ^{125}J-Insulinbindung in Abwesenheit von nativem Insulin oder anderen Antagonisten gleich 100% gesetzt, nehmen die Radiojodinsulinbindungen bei verschiedenen Antagonistenkonzentrationen Werte zwischen 100 und 0% an.
Die Konzentration, bei der 50% der ursprünglichen ^{125}J-Insulinbindung verdrängt ist, also ED_{50}, soll im weiteren als Verdrängungskonstante K_v bezeichnet werden.
Um diese Konstanten verschiedener Stoffe untereinander vergleichen zu können, ist es Bedingung, daß die ^{125}J-Insulinkonzentration in allen Versuchen gleich ist. Unter dieser Bedingung ist eine gewisse Proportionalität zu den Dissoziationskonstanten anzunehmen.
Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte mit Stoffwechseleffekten werden die Antagonisten als "Mischungen aus nativem Rinderinsulin und einem inerten Stoff gleicher Molmasse" betrachtet. Anhand der Verdrängungskonstanten wird berechnet, wieviel Mol% natives Insulin in der jeweiligen "Mischung" stecken:

$$X\ (\text{Mol\%}) = 100 \cdot K_v(\text{Antagonist X}) : K_v(\text{natives Rinderinsulin})$$

Beispiel: Eine Substanz, deren K_v zehnmal so groß ist wie der K_v des nativen Insulins "enthält 10% nativer Insulinaktivität" oder anders ausgedrückt, die Substanz zeigt 10% Insulinwirkung. Damit ist auch gleichzeitig die Querverbindung zu Blutzucker-, Mäusekrampftest und Glukoseoxidation gegeben, da diese ebenfalls auf % Insulinwirkung normiert sind.

Bei den folgenden Ergebnissen von Verdrängungstests am Insulinrezeptor von Fettzellen wird, wann immer es die Linearisierbarkeit der Meßwerte zuläßt, versucht, die Ergebnisse aus den Dixon-Diagrammen zu erhalten und den im "Schnellverfahren" ermittelten "Verdrängungskonstanten" gegenüberzustellen.

In den anschließenden Abschnitten werden die Ergebnisse aus Experimenten mit zahlreichen verschiedenen Substanzen dargelegt; vorangestellt ist eine Typkurve mit nativem Rinderinsulin zur Standardisierung aller folgenden Resultate.

Bei einigen Substanzen ohne enge Beziehung zur Insulinsequenz, bei denen also eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor fraglich, aber dennoch eine konzentrationsabhängige Senkung der ^{125}J-Insulinbindung festzustellen ist, wurde außerdem die Einwirkung auf die Zellmembran gemessen.

Einmal wurden dabei Einflüsse auf die Fluidität oder den Ladungszustand der Membran untersucht, welche den Insulinrezeptor als integriertes Membranprotein beeinflussen; dabei kann durch "mechanische" Blockierung der freien Beweglichkeit des Rezeptors eine Bindung von ^{125}J-Insulin verhindert werden, was im Experiment eine Verdrängung vorspiegelt (Allosterie).

Diese Effekte lassen sich durch eine Meßreihe mit variierter Inkubationszeit erfassen. Wird die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichtes (maximale Bindung) verlängert, sind solche Membraneffekte im Spiel.

Der zweite erfaßte Effekt ist die Membrantoxizität, die zur Lyse der Zellen und damit zum Bindungsverlust führt. Diese "Bestimmung der Überlebensrate" wurde schon bei der Optimierung des Testsystems vorgestellt.

Die Beachtung dieser beiden Parameter ist darum erwähnenswert, weil sie in Veröffentlichungen ähnlicher Rezeptortests bisher noch nicht berücksichtigt wurden. Sie bieten aber eine gute Möglichkeit zur Ausschaltung von Fehlern.

3.1. Dosisabhängige Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Insulinrezeptor an Fettzellen durch natives Rinderinsulin

Zur Messung wurden die Fettzellen mit 82 pMol/l ^{125}J-Insulin inkubiert in Gegenwart wechselnder Konzentrationen von nativem Rinderinsulin im Bereich von 12 nMol/l bis 37,4 µMol/l . Gemessen wurde die nach Zentrifugation in der Zellphase gebundene Radioaktivität in den beschriebenen Ansätzen und in einem Ansatz ohne natives Insulin. Die gebundene Radioaktivität in Gegenwart von 37,4 µMol nativen Insulins, die "unspezifische Bindung", wird von allen anderen Meßwerten subtrahiert, wobei die "spezifische Bindung" erhalten wird.

Zur Auswertung wird einmal die gebundene Radiojodinsulinkonzentration ($B_{(nI)}$) gegen die zugegebene native Insulinkonzentration aufgetragen und einmal die reziproke gebundene Radiojodinsulinkonzentration gegen die zugegebene native Insulinkonzentration (nach Dixon).

Im ersten Fall wird nicht der Absolutwert der gebundenen ^{125}J-Insulinkonzentration angegeben sondern eine reduzierte Größe, die durch Division durch die Bindung ohne natives Insulin (B_o) und Multiplikation mit 100 entsteht:

$$B\ (\%) = 100 B_{(nI)} : B_o \quad .$$

Aus der Abb.18 kann eine K_v von 60 nMol/l entnommen werden. Die in Abb.18a dargestellte Auftragung nach Dixon zeigt eine sigmoide Kurve, aus der keine einheitliche Steigung abzulesen ist. Durch die Konzentrationsabhängigkeit der Steigung wird auch die Inhibitorkonstante K_i konzentrationsabhängig.

In Abb.18b ist diese Abhängigkeit dargestellt. Die mittlere Inhibitorkonstante $\overline{K}_i$ beträgt 40 nMol/l, an der Stelle der maximalen Steigung, die mit dem Bereich der halbmaximalen Verdrängung zusammenfällt, ist K_i = 25 nMol/l .

In Tab.9 sind noch einmal die für Abbildungen verwendeten Werte nebeneinandergestellt.

Abb.18

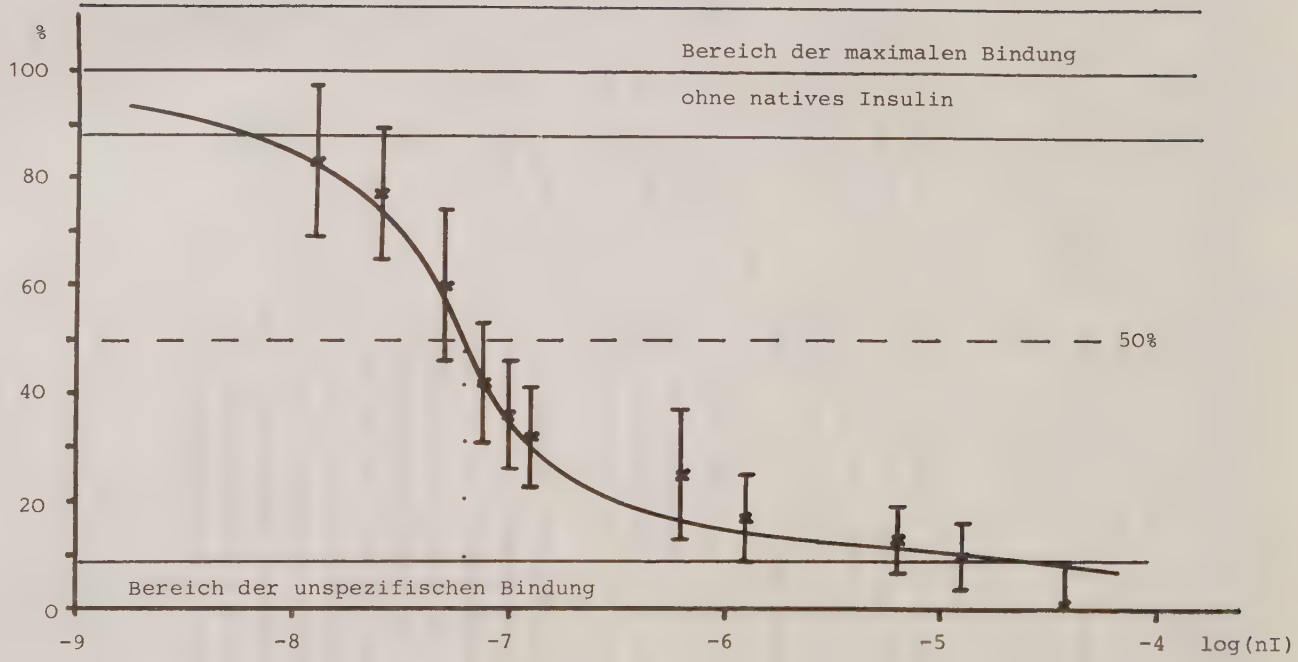
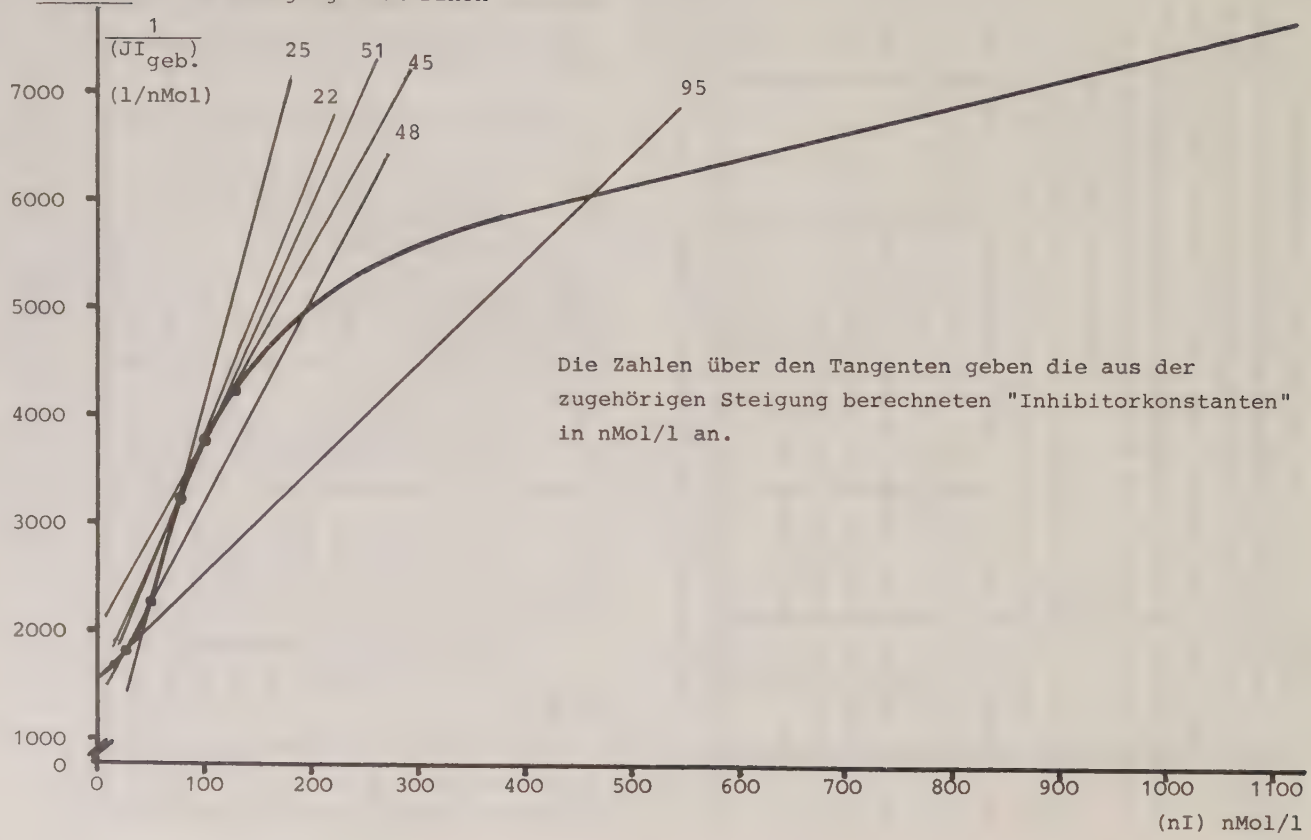
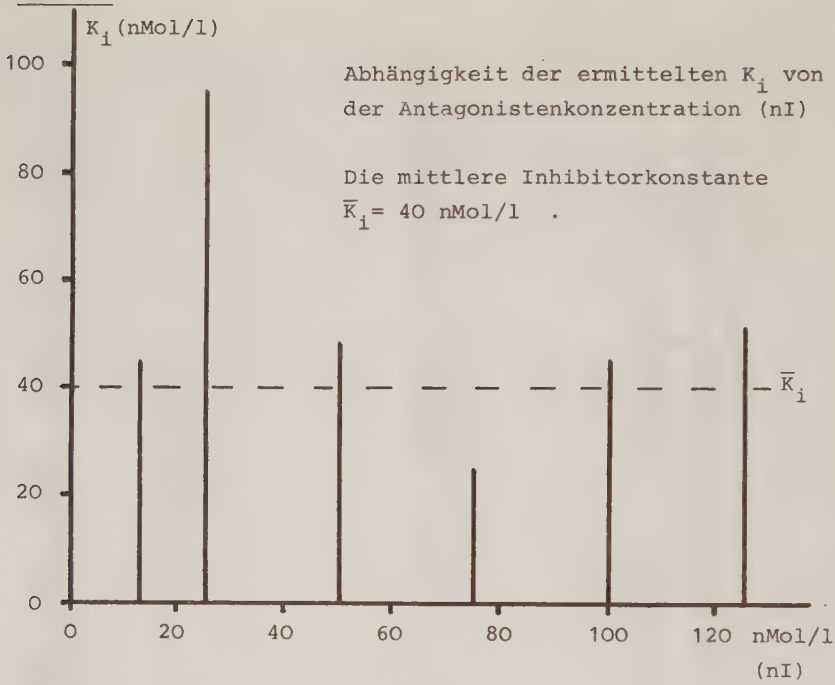

%
100
80
60
40
20
0
Bereich der maximalen Bindung
ohne natives Insulin
50%
Bereich der unspezifischen Bindung
-9
-8
-7
-6
-5
-4
log(nI)

Abb.18a Auftragung nach Dixon



Die Zahlen über den Tangenten geben die aus der zugehörigen Steigung berechneten "Inhibitorkonstanten" in nMol/l an.

Abb.18b



Tab.

n	(nI) nMol/l	log(nI) +9	$(JI_{geb.})$ %	$(JI_{geb.})^{-1}$ l/nMol	Steigung	K_i nMol/l
25	0	--	100±12	1363	---	---
15	12,5	1,096	83±14	1643	22,32	44
20	25,0	1,397	77±12	1770	10,24	95
20	49,9	1,698	60±14	2271	20,12	48
20	74,8	1,874	42±11	3244	39,08	25
20	99,7	1,999	36±10	3785	21,73	45
20	124,7	2,096	32± 9	4258	18,92	51
5	623,3	2,795	25±12	5450	2,39	407
5	1246,6	3,095	17± 8	8015	4,12	236
5	6232,9	3,795	13± 6	10481	0,49	1986
5	12466	4,095	10± 6	13625	0,50	1946
25	37397	4,573	0± 9	---	---	---

3.2.1. Dosisabhängige Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Insulinrezeptor an Fettzellen durch Insulin-A- und B-Ketten-S-Sulfonate

Da das Insulinmolekül aus 2 durch Disulfidbrücken verbundenen Peptidketten besteht, ist es naheliegend, bei einer Untersuchung der partiellen Abbauprodukte des Insulins zuerst die beiden nicht proteolytisch sondern durch S-S-Spaltung getrennten Einzelketten einzusetzen.

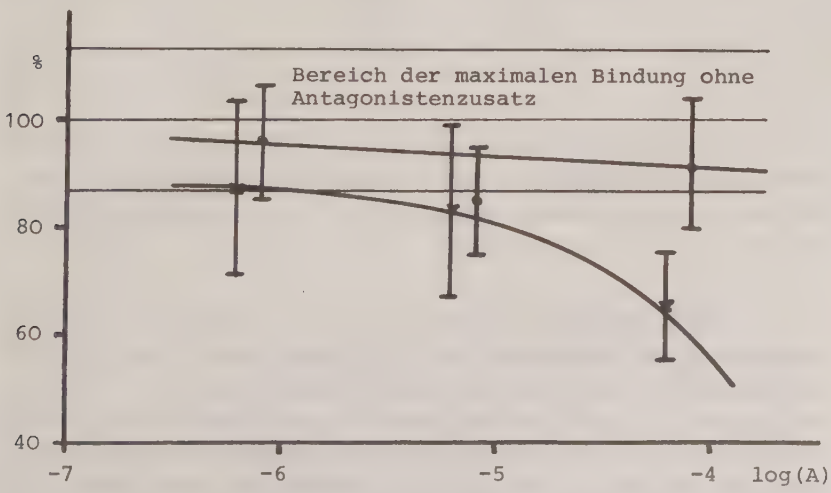
Die Insulinfragmente, die zur Verfügung standen, waren die gereinigten S-Sulfonate von A- und B-Kette des Insulins. Diese wurden in Verdünnungsreihen bis 79 µMol/l (A-Kette) bzw. 59 µMol/l (B-Kette) eingesetzt.

Die Ergebnisse sind in Abb.18 dargestellt.

Dabei zeigt sich, daß die A-Kette inaktiv ist, während bei der B-Kette eindeutig eine Verdrängung zu erkennen ist,deren ED_{50} allerdings über dem untersuchten Bereich liegt, nach der Zeichnung geschätzt bei 130 µMol/l. Eine Abschätzung nach Dixon ergibt ein K_i von 114 µMol/l.

Der weitere Verlauf der Kurve nach höheren Antagonistenkonzentrationen konnte mangels ausreichender Substanzmengen nicht weiterverfolgt werden.

Abb.19



(A) = Antagonistenkonzentration (Mol/l)

3.2.2. Dosisabhängige Verdrängung von ^{125}Jodinsulin vom Insulinrezeptor an Fettzellen durch partiell proteolytisch abgebaute Rinderinsulinmoleküle

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse von Verdrängungstests mit Desoctapeptid(B23-30)-Insulin (= DOPI) und Desnonapeptid-(B22-30)-Insulin (= DNPI) zusammengefaßt.
Die Pentamethylester dieser Abbauprodukte sind Ausgangsmaterial zur Herstellung semisynthetischer Insulinderivate (5.-9.), von denen einige im folgenden Abschnitt untersucht werden.
Die nach Bauer und Rehe hergestellten (8.,9.) Methylester wurden alkalisch demethyliert und über Sephadex G-50 fine von Polymerisationsprodukten befreit. Aus den Aminosäureanalysen geht hervor, daß beide Peptide rein sind. "DOPI" ist frei von Lysin und "DNPI" frei von Lysin und Arginin.
Die zum Test eingesetzten Verdünnungsreihen reichten bis 46 µMol/l beim "DOPI" und bis 44,5 µMol/l beim "DNPI".
Die Ergebnisse der Verdrängungstests sind in Abb.20a und b dargestellt. In der folgenden Tabelle stehen die aus den Abbildungen ermittelten ED_{50} den nach Dixon abgeschätzten K_i-Werten zum Vergleich gegenüber.

Tab.10

	ED_{50}(uMol/l)	K_i(uMol/l)
"DOPI"	0,84	0,644
"DNPI"	5,0	3,15

Beide Werte zeigen, daß durch Entfernen des Arginin (B22) ein drastischer Aktivitätsabfall von rund 80% zu beobachten ist. Das bestätigt die von Weitzel et al. (6.) an anderen Testsystemen erhaltenen Ergebnisse.

3.2.3. Dosisabhängige Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Insulinrezeptor an Fettzellen durch Methylester von Insulin und dessen partiell-proteolytischen Abbauprodukten

Es ist bekannt, daß die Konformation des Insulins von entscheidender Bedeutung für seine biologische Aktivität ist. Diese Konformation wird sicherlich zu einem bedeutenden Anteil durch ionische Wechselwirkungen zwischen sauren und basischen Gruppen

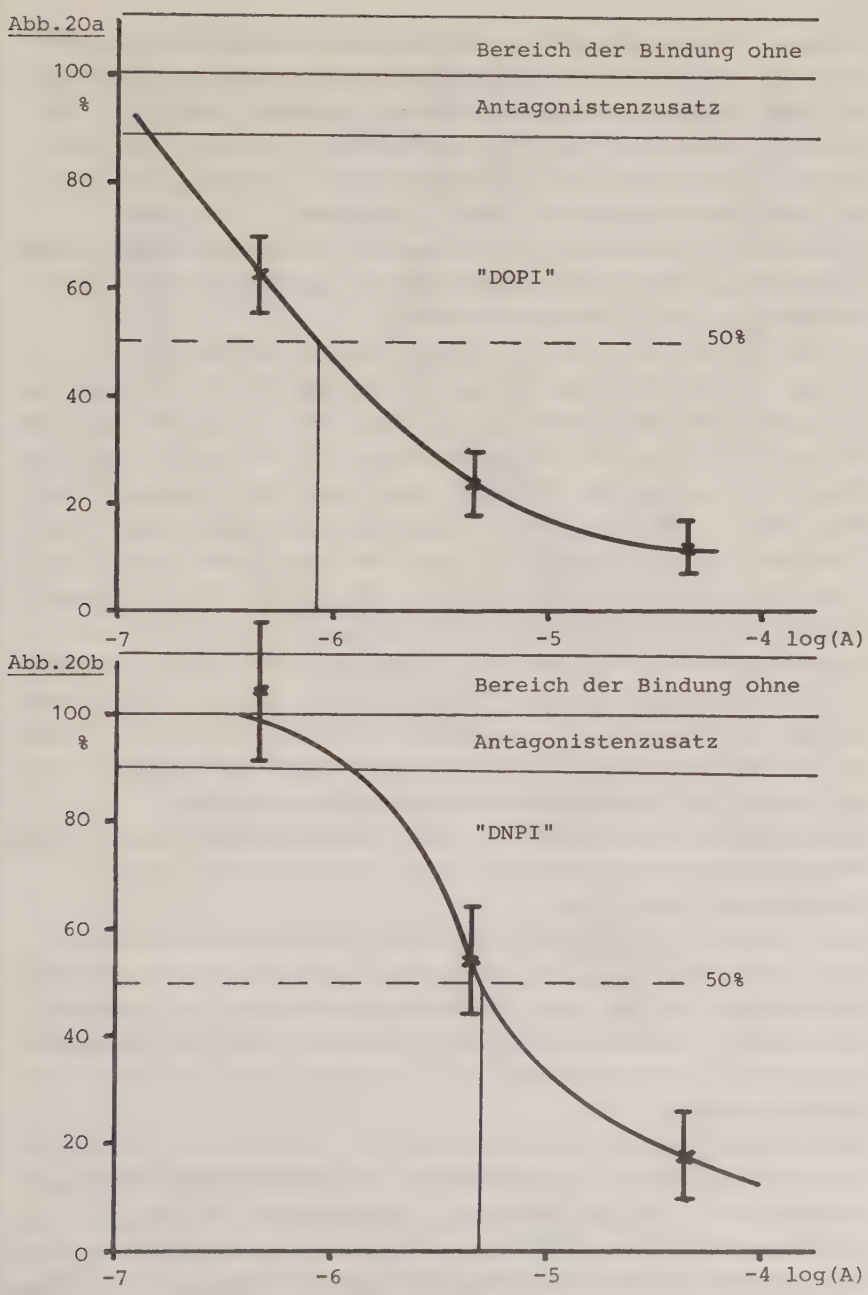


Abb.20a
Bereich der Bindung ohne
Antagonistenzusatz
100
%
80
60
40
20
0
"DOPI"
50%
-7
-6
-5
-4 log(A)
Abb.20b
Bereich der Bindung ohne
Antagonistenzusatz
100
%
80
60
40
20
0
"DNPI"
50%
-7
-6
-5
-4 log(A)

getragen. Daher erschien es interessant zu erfahren, ob und wie sich die Bindungseigenschaften des Insulins bei Unterbrechung der Säure-Base-Wechselwirkungen verhalten, wenn z.B. die 6 sauren Funktionen des Insulinmoleküls in Methylester überführt sind. Sowohl Insulinhexamethylester ($I(OMe)_6$) als auch die Pentamethylester von "DOPI" ($DOPI(OMe)_5$) und "DNPI" ($DNPI(OMe)_5$) standen als Vorstufen der Präparation semisynthetischer Insulinderivate zur Verfügung und konnten so in den Verdrängungstest eingesetzt werden.

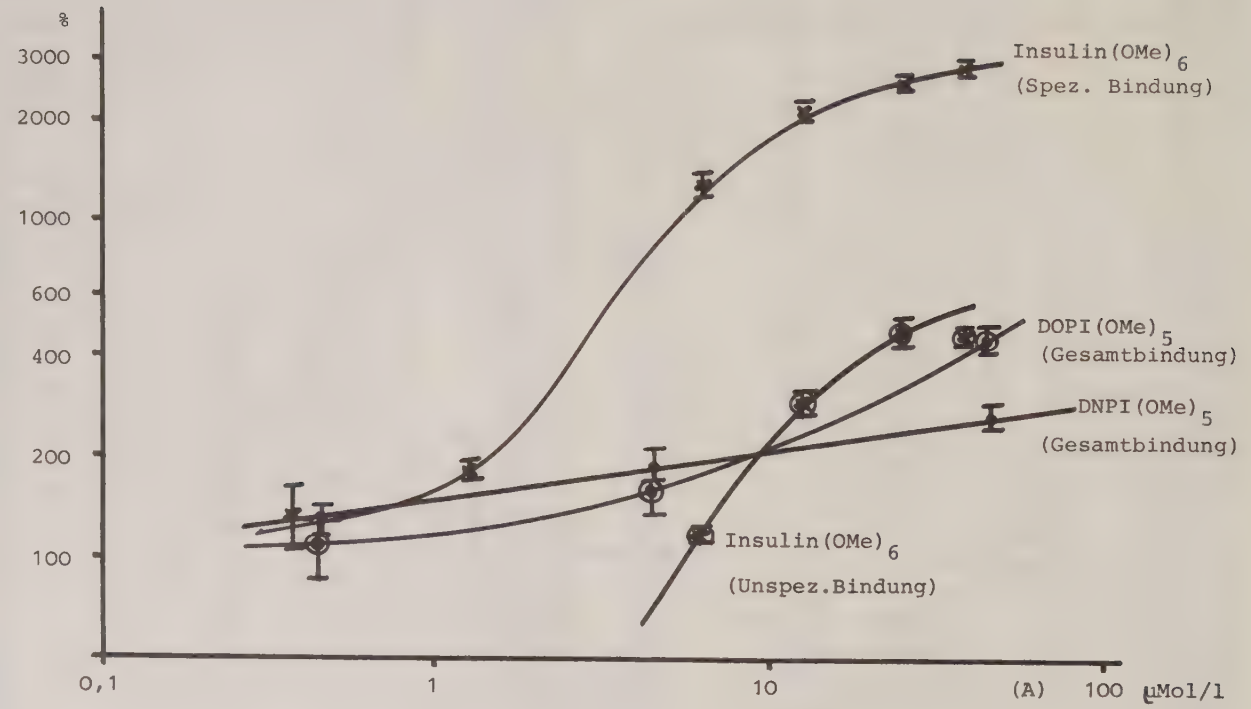
In Abb.21 ist das Ergebnis dieser Versuche dargestellt. Dieses Ergebnis ist nur schwer zu interpretieren, da statt der zu erwartenden dosisabhängigen Abnahme der ^{125}J-Insulinbindung an den Fettzellen eine dosisabhängige Zunahme der Bindung eintrat. Zur Deutung des Effektes wären drei Möglichkeiten denkbar: Einmal könnten auf den Rezeptoren zusätzliche Rezeptoren freigesetzt werden; dafür spricht, daß der Effekt beim $I(OMe)_6$ sättigbar scheint; dagegen jedoch, daß die 24-fache Bindungserhöhung eine zu große Anzahl "latenter" Rezeptoren voraussetzen würde. Cuatrecasas (49.) fand bei seiner "Demaskierung" von Insulinrezeptoren mit Phospholipasen eine 4-6-fache Zunahme der Rezeptorzahl, die er jedoch auch mit Digitonin, Vitamin K_5 und Mellitin, also 3 Stoffen, die bekanntlich Phospholipidstrukturen in Membranen zerstören, nachahmen konnte.

Die lipophilen Eigenschaften des Insulinhexamethylesters lassen Membranaktivität erwarten. Da aber setzt auch die zweite Deutungsmöglichkeit an:

Wenn durch die Membranaktivität die Membran perforiert wird, kann Radiojodinsulin frei eindringen und wird so als "gebunden" registriert. Da aber die Unspezifische Bindung (in Gegenwart von $I(OMe)_6$ + Überschuß nativen Insulins) nicht gleichermaßen ansteigt wie die Gesamtbindung, ist diese Erklärung eher unwahrscheinlich.

Der Befund spricht eher für die dritte Deutung, daß die lipophilen Methylester in die Membran integriert werden und durch Dimerbildung, die für $DOPI(OMe)_5$ nachgewiesen ist (34.), "Hybriddimere" mit dem ^{125}J-Insulin bilden. In diesem Falle würden also die Methylester als "Pseudorezeptoren" wirken. Doch diese Fragen weiter abzuklären, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen

Abb. 21


%
3000
2000
1000
600
400
200
100
0,1
1
10
(A)
100 µMol/l
Insulin(OMe)6
(Spez. Bindung)
DOPI(OMe)5
(Gesamtbindung)
DNPI(OMe)5
(Gesamtbindung)
Insulin(OMe)6
(Unspez.Bindung)

3.3. Dosisabhängige Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Insulinrezeptor an Fettzellen durch semisynthetische Insulinderivate

Es wurden zwei verschiedene Gruppen von Verbindungen mit je zwei Vertretern untersucht.

3.3.1. Despentapeptid(B26-30)-insuline

Zu dieser Gruppe gehörten:
Despentapeptid(B26-30)-insulin(B22-Ala) (= DPPI-Ala) und
Despentapeptid(B26-30)-insulin(B22-Lys) (= DPPI-Lys) .
Die eingesetzten Verdünnungsreihen der Insulinderivate reichten beim "DPPI-Ala" bis 786 nMol/l und beim "DPPI-Lys" bis 347 nMol/l ; die Ergebnisse sind in Abb.22a und b dargestellt, die Diagramme nach Dixon in Abb.22c und d .
Es wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Werte bestimmt:

Tab.11

	ED_{50}(nMol/l)	K_i(nMol/l)
"DPPI-Ala"	513	558
"DPPI-Lys"	224	240

Es zeigt sich, daß beide Verbindungen eine wesentlich stärkere Bindung an den Rezeptor zeigen als "DNPI" und sogar etwas stärker als "DOPI" wirken.
Die Einführung der beiden Phe-Aromaten kann also das Fehlen des Arginin (B22)-Restes im Verdrängungstest kompensieren, eine basische Gruppe am B22 verstärkt den Effekt nochmals durch Verdopplung der Bindungsfestigkeit.

3.3.2. Destripeptid(B28-30)-insuline

Zu dieser Gruppe gehörten:
Destripeptid(B28-30)-insulin(B22-Ala,B27-Ala) (= DTPI-Ala_2)
Destripeptid(B28-30)-insulin(B22-Glu,B27-Ala) (= DTPI-Glu-Ala).
Die eingesetzten Verdünnungsreihen der Insulinderivate reichen beim 'DTPI-Ala_2" bis 644 nMol/l und beim 'DTPI-Glu-Ala" bis 478 nMol/l; die Ergebnisse sind in Abb.23a und b dargestellt, die Diagramme nach Dixon in Abb.23c und d .
Es wurden die in Tab.12 aufgelisteten Werte bestimmt.

Abb. 22a

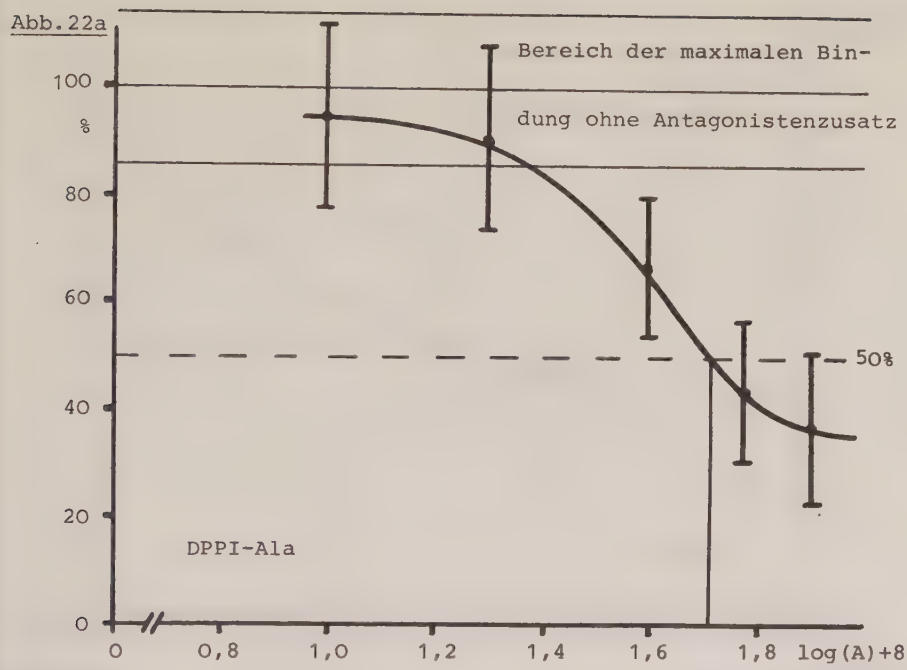
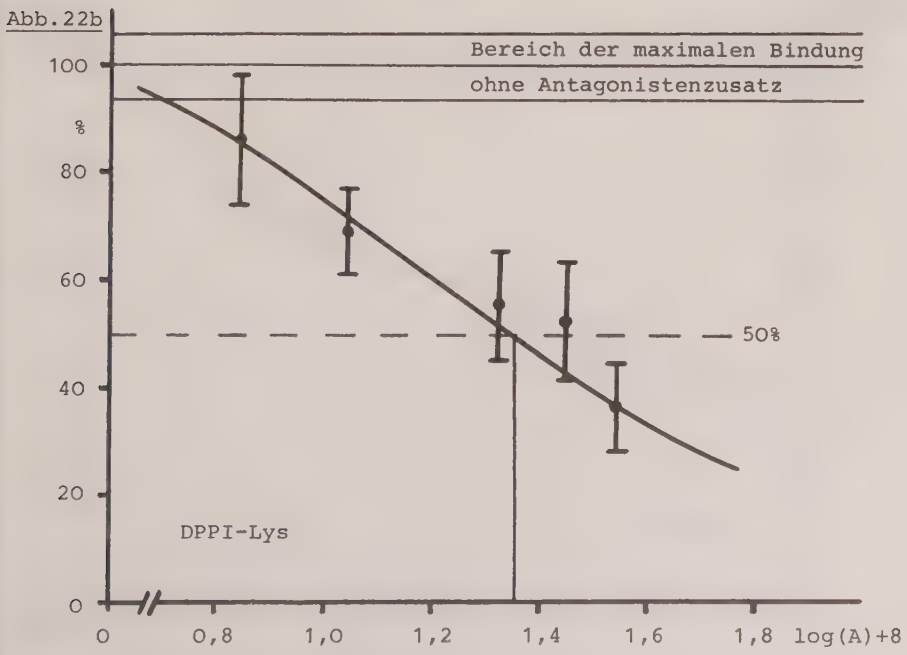


Abb. 22b



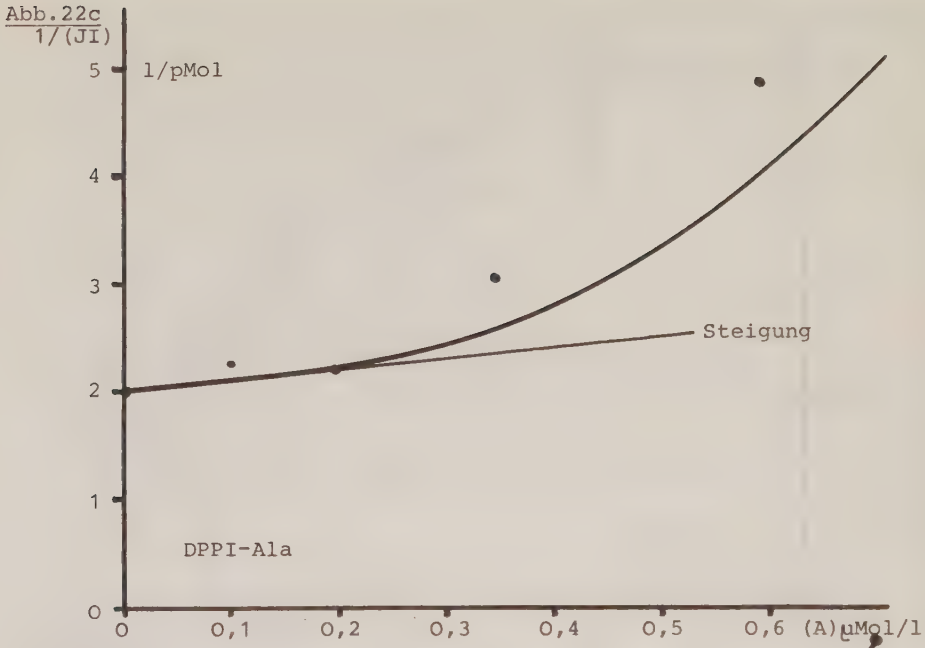


Abb.22c

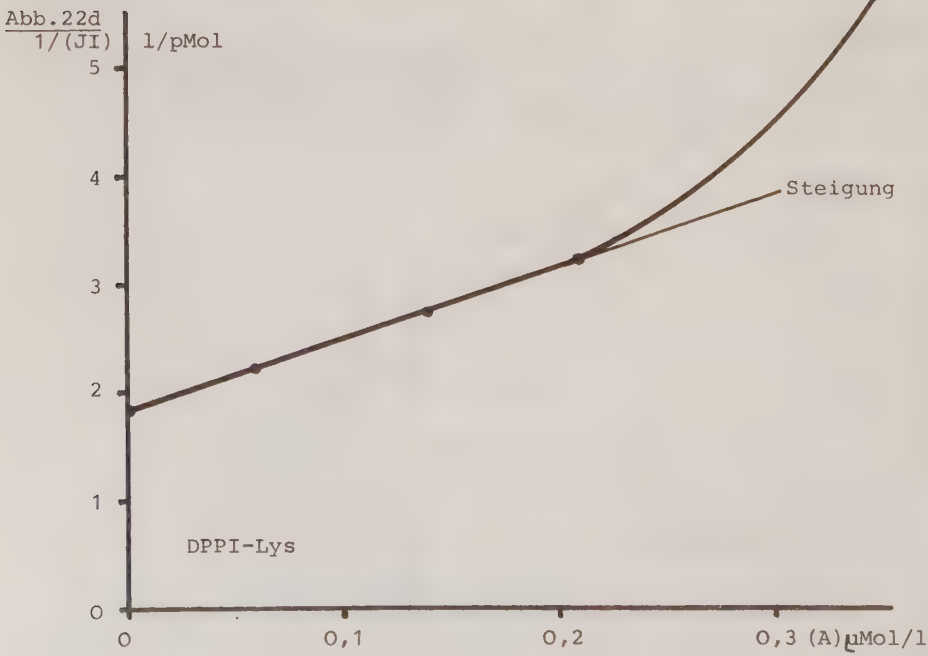


Abb.22d

Abb.23a

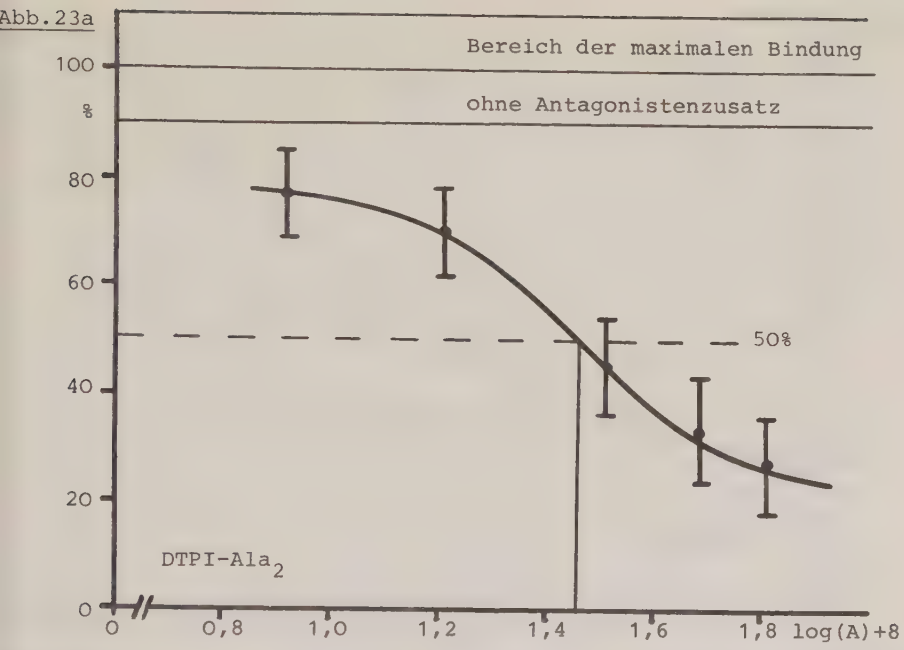
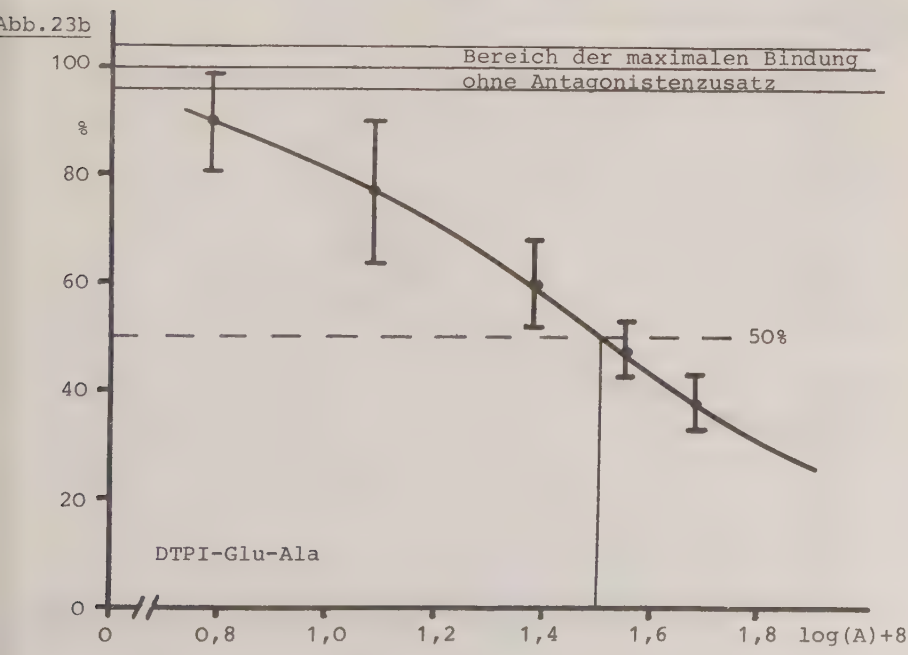


Abb.23b



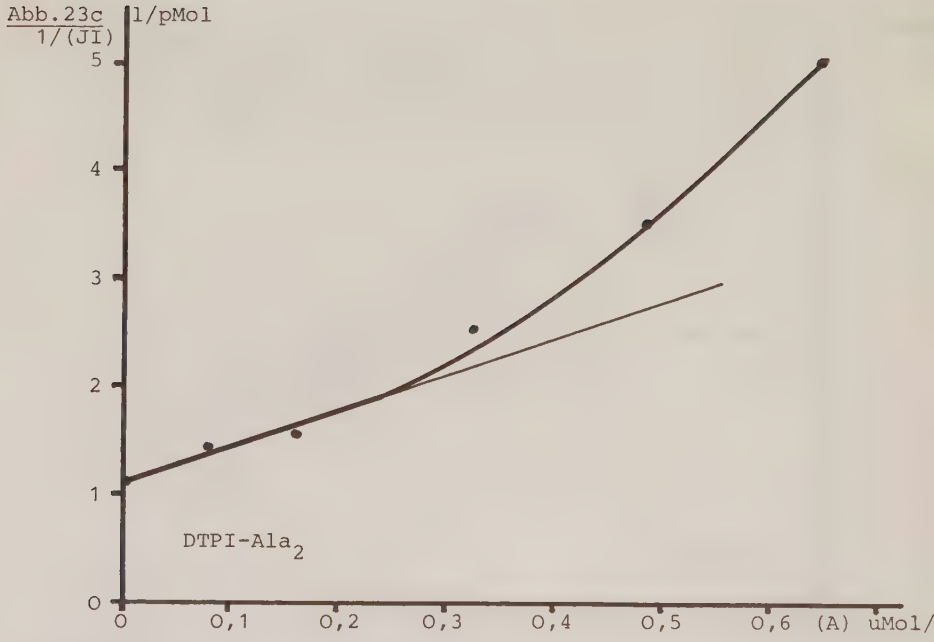


Abb.23c
1/(JI)
1/pMol
5
4
3
2
1
0
DTPI-Ala2
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
(A) uMol/

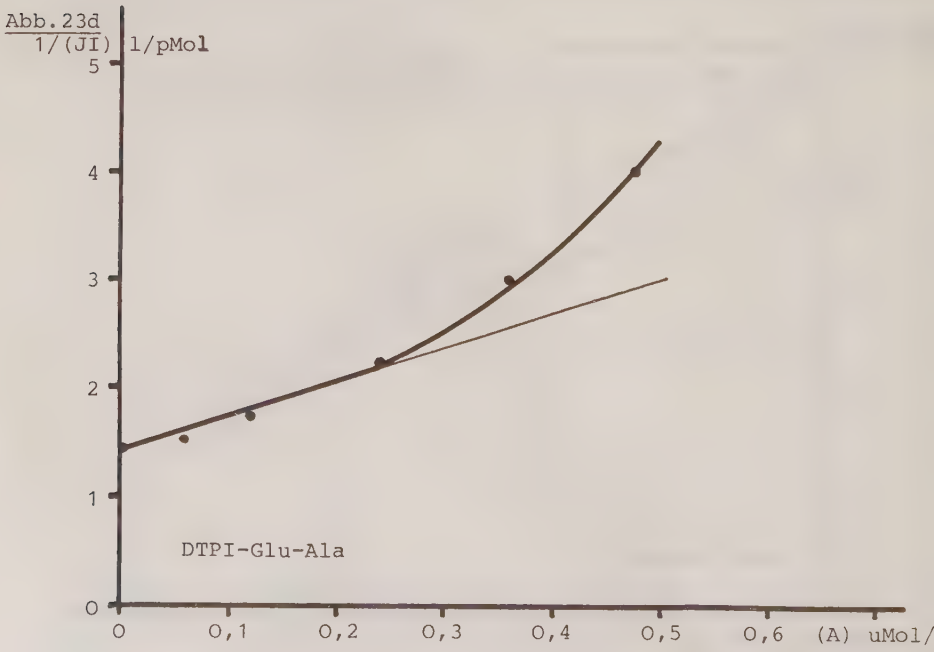


Abb.23d
1/(JI)
1/pMol
5
4
3
2
1
0
DTPI-Glu-Ala
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
(A) uMol/

Tab.12

	ED_{50}(nMol/l)	K_i(nMol/l)
"DTPI-Ala_2"	288	269
"DTPI-Glu-Ala"	320	302

Beide Verbindungen liegen mit ihren Bindungseigenschaften in der Nähe des DPPI-Lys, es wird also wiederum ein Fehlen der basischen Gruppe am B22 durch die Einführung einer zusätzlichen aromatischen (Tyr-) Funktion an B26 kompensiert.

3.4. Dosisabhängige Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Insulinrezeptor an Fettzellen durch niedermolekulare Oligopeptide

In den vergangenen Jahren wurden von Weitzel et al.(1.-3.) synthetische Partialsequenzen des Insulinmoleküls(B22-25, B22-26, B22-B27, ...u.a.) vorgestellt, die zum Teil an Fettzellen eine insulinähnliche biologische Wirkung zeigten.Obwohl in der Veröffentlichung von 1975 (3.) bezweifelt wird, daß diese Peptide am Rezeptor angreifen, konnte dies nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

T.L.Blundell et al.(63., 64.) beschreiben in ihren Arbeiten die Insulin-Rezeptor-Wechselwirkung als analog der Insulin-Insulin-Dimerbildung mit einer Bindungsregion,deren größter Anteil durch die Sequenz B23-27 getragen wird. Unabhängig davon untersuchten S.Kubota et al. (65.) die Dissoziation des Insulin-Dimers in Gegenwart von Partialsequenzen (B23-25 und B23-29) des Insulins und stellten fest, daß bei einem 30-50-fachen Überschuß des Peptides gegenüber dem Insulindimer nahezu quantitative Dissoziation erzielt werden konnte.

Sollte die Annahme von Blundell et al. richtig sein, müßten sich die Ergebnisse von S.Kubota voll auf die Insulin-Rezeptorbindung anwenden lassen, es müßte also ^{125}J-Insulin deutlich vom Insulinrezeptor der Fettzellen verdrängt werden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden fünf synthetische Peptide (4.) aus der oben erwähnten Serie B22-... sowie eins der Sequenz B4-10 in den Verdrängungstest eingesetzt und ihre Wechselwirkung mit dem Insulinrezeptor untersucht.

Bei den Peptiden handelte es sich um:

Arg-Gly-Phe-Phe-$NH_2 \cdot 2HCl$ (B22-25)
N_α-Ac-Arg-Gly-Phe-Phe-$NH_2 \cdot HCl$ (B22-25)
Arg-Gly-Phe-Phe-ß-Ala·HCl (B22-26, B26-ß-Ala)
Arg-Gly-Phe-Phe-Ala-$NH_2 \cdot 2HCl$ (B22-26, B26-Ala)
Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala·HCl (B22-27, B27-Ala)
$(Gln\text{-}His\text{-}Leu\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Ser\text{-}His)_2$ (B4-10)

Der untersuchte Konzentrationsbereich wurde von 3 bis 360 µMol/l gewählt, die ^{125}J-Insulinkonzentration mit 82 pMol/l, so daß die Peptide in einem 36-tausend- bis 44-millionenfachen Überschuß vorlagen. Dieser Überschuß mußte zur Feststellung eines spezifischen Effektes ausreichen.

Bedauerlicherweise war von diesen Effekten nicht das geringste zu messen; da die Meßwerte alle im Bereich der maximalen Bindung ohne Antagonistenzusatz lagen, wurde darauf verzichtet, diese hier darzustellen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß, im Widerspruch zu den Hypothesen von T.L.Blundell et al., die Insulin-Rezeptor-Wechselwirkungen anderen Gesetzmäßigkeiten unterliegen als die Insulin-Insulin-Wechselwirkungen im Dimer.

Gleichzeitig wurden die Annahmen von Weitzel et al. (3.) bestätigt, nach denen biologische Wirkungen kleiner Peptide unabhängig vom Insulinrezeptor ausgelöst werden.

Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch Feng-You-min et al. bei der Untersuchung ähnlicher Peptide (66.).

4. Versuche mit Substanzen ohne Beziehung zur Insulinsequenz

Die Leistungsfähigkeit der in Abschnitt 2. entwickelten Methodik gegenüber Verbindungen mit partieller oder veränderter Insulinstruktur wurde in Abschnitt 3. demonstriert.
Hier nun soll an einigen Beispielen gezeigt werden, daß man mittels des ^{125}J-Insulin-Rezeptorbindungstests auch Aussagen über insulinfremde Systeme gewinnen kann.

4.1.Einfluß von niedermolekularen, nicht blutzuckersenkenden Basen auf die ^{125}J-Insulin-Rezeptorbindung an Fettzellen

Unter der Bezeichnung "niedermolekulare Basen" sind hier drei Verbindungen zusammengefaßt, die als Gemeinsamkeit die Nichtpeptidstruktur, basische Gruppen und in verschiedenen Systemen (10.) Insulinaktivität besitzen, doch nicht den Blutzucker senken. Über den Wirkungsmechanismus ist allerdings noch nichts bekannt.
Um Aussagen über eine eventuelle Beeinflussung des Insulinrezeptors durch eine Vielzahl von bisher bekannten Amino- und Guanidinoverbindungen mit ähnlichem Verhalten zu gewinnen, wurden drei typische Vertreter ausgewählt und dem Verdrängungstest unterworfen. Diese drei waren:
Spermidin,
C_6-Homoagmatin (6-Guanidino-1-amino-hexan = 6HA) und
6-Guanidino-hexansäure-dimethylamid (= 6G-DMA).
Es wurden zum Verdrängungstest jeweils Konzentrationen bis 1 mMol/l eingesetzt. Tab.13 und die Abbn.24a-c zeigen den Verlauf der ^{125}J-Insulinbindung im untersuchten Bereich.

Tab.13

Konz. (mMol/l)	Spermidin (%)	n	6G-DMA (%)	n	6HA (%)	n
0	100 ± 10	18	100 ± 10	18	100 ± 10	18
0,01	104 ± 10	6	90 ± 12	6	99 ± 9	6
0,1	91 ± 6	6	85 ± 8	6	97 ± 14	6
1,0	78 ± 10	6	87 ± 10	6	87 ± 10	6

Die Verdrängungseffekte bei allen drei Verbindungen sind nicht als signifikant zu bezeichnen.

Abb.24a

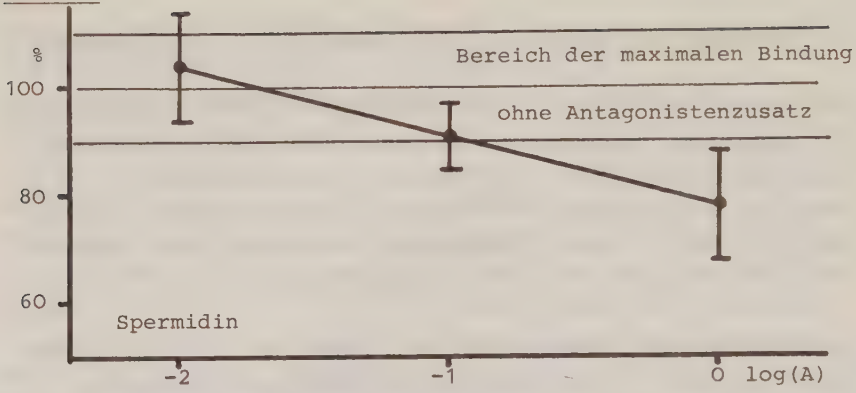


Abb.24b

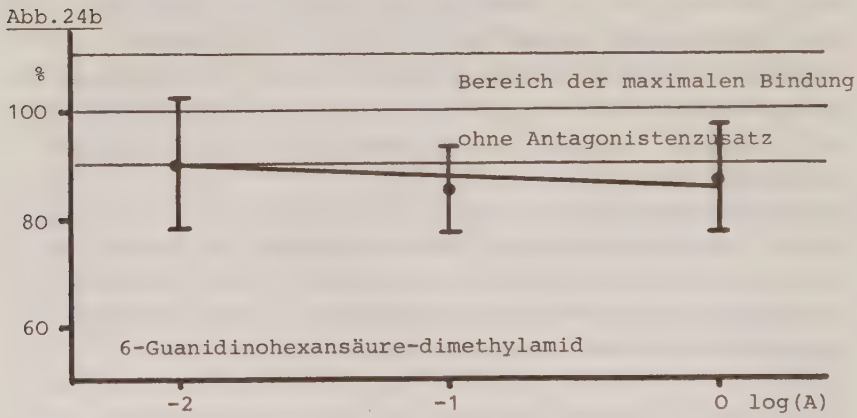
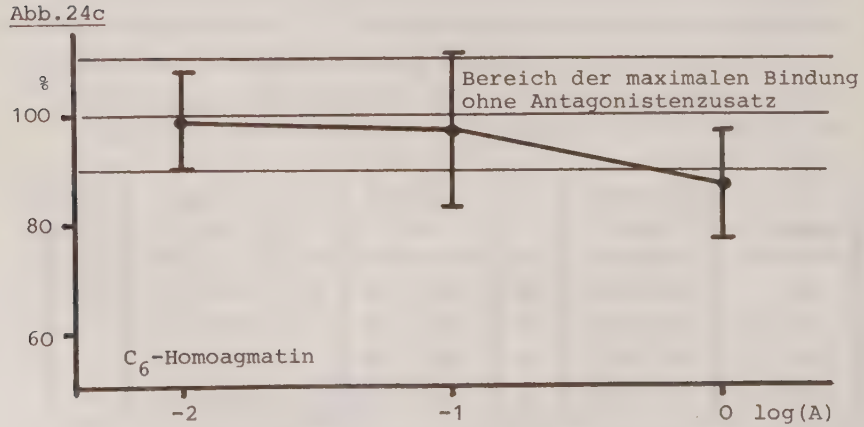


Abb.24c



Es läßt sich also sagen, daß eine Wechselwirkung dieser Substanzen mit dem Insulinrezeptor der Fettzellen als sehr unwahrscheinlich betrachtet werden muß. Doch können auch andere Effekte, wie z.B. Wechselwirkungen mit der Zellmembran für die insulinähnliche Wirkung verantwortlich sein. Diese Wechselwirkungen können fluiditäts- oder ladungsverändernder Art sein oder gar die Zellmembran schädigen.
Im letzteren Falle werden die geschädigten Zellen lysieren, und die Zelldichte nimmt zeitabhängig ab. Diesen Effekt kann man mittels des Rezeptorbindungstests quantitativ bestimmen, da die Konzentration der zellgebundenen Rezeptoren proportional der Zelldichte ist und man durch Messung der ^{125}J-Insulinbindung in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit die Abnahme der Zelldichte bestimmen kann. Dabei ist zu beachten, daß die Inkubation mit ^{125}J-Insulin ebenfalls ein zeitabhängiger Vorgang ist. Daher muß man die Inkubationszeit konstant halten und die gewünschte Zeit durch Variation der Präinkubationszeit mit dem zu testenden Stoff einstellen.
Als Konzentration wurde in allen drei Fällen die Maximalkonzentration der Verdrängungstests, also 1 mMol/l gewählt, die spezifische ^{125}J-Insulinbindung zur Zeit t = O als 100% gesetzt und die Abnahme der Bindung mit zunehmender Präinkubationszeit mit dem Verlauf der Abnahme in Abwesenheit jeglicher Zusätze verglichen (als Streubereich in den Diagrammen eingetragen).
Die Abbn.25a-c zeigen die Ergebnisse dieser Versuche:
Nur C_6-Homoagmatin bewirkt eine signifikante Beschleunigung der Zellabnahme, wirkt also toxisch oder membranschädigend. Bei dem zellvertrauten Spermidin war dieser Effekt auch nicht zu erwarten, während beim 6-Guanidinohexansäure-dimethylamid die neue Erkenntnis gewonnen werden konnte, daß seine physiologischen Wirkungen nicht auf Zell- oder Membranschädigung zurückzuführen sind.
Die nichttoxische "allosterische" Einwirkung dieser Substanzen über die Membran wurde nicht erst untersucht, da in diesem Falle in den Verdrängungstests stärkere Effekte aufgetreten wären.

Abb.25a

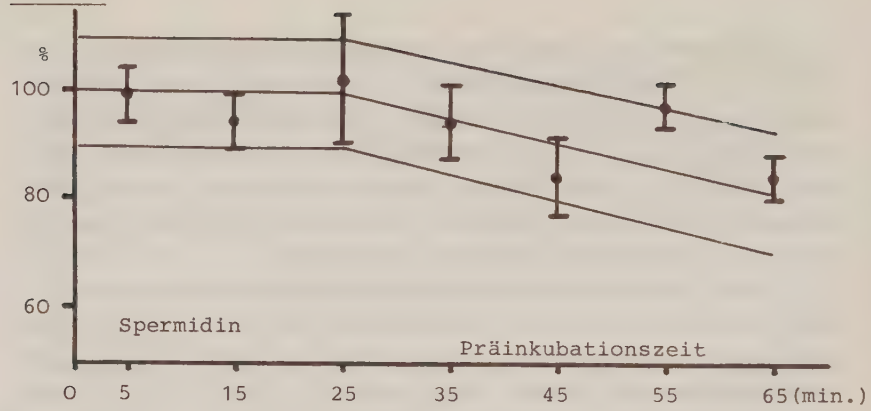


Abb.25b

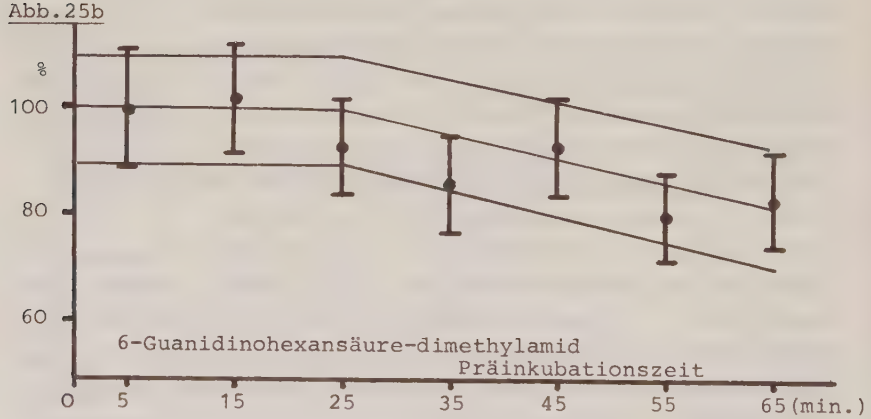
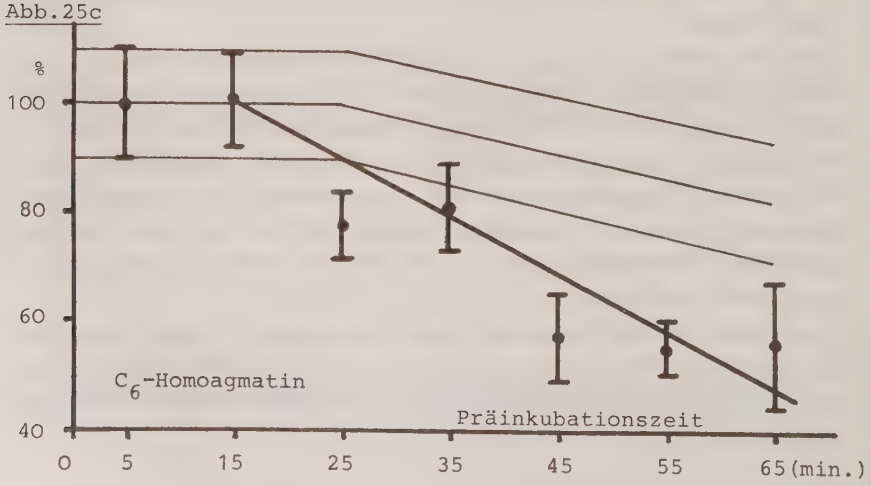


Abb.25c



4.2. Einfluß von Inositphosphatid aus Sojabohnen auf die ^{125}J-Insulin-Rezeptorbindung an Fettzellen

In seiner Eigenschaft als integriertes Membranprotein ist der Insulinrezeptor ein empfindlicher Indikator für Veränderungen in Zusammensetzung und Fluidität der Plasmamembran von Fettzellen (49.). Die zitierte Arbeit von Cuatrecasas untersucht u.a. den Einfluß von Serinphosphatid, Äthanolaminphosphatid, Lecithin und von verschiedenen Lysophosphatiden auf die Insulin-Rezeptorbindung an isolierten Fettzellmembranen.
Nicht untersucht wurden die Effekte von Inositphosphatid (PI), das im Verdacht steht, in irgendwelchen Stoffwechselbeziehungen zum Insulin zu stehen, da dieses im Gegensatz zu anderen Phospholipiden in der Lage ist, insulinabhängige Glukoseaufnahme und Glukoseoxidation zu modulieren (Dr.W.Sarrazin, persönl. Mitt., noch nicht veröffentlicht, außerdem 67. und 68.).
Es war nun interessant, auch etwas über die Auswirkung der niedermolekularen, nichtbasischen, nicht blutzuckersenkenden Substanz Inositphosphatid auf die Insulin-Rezeptorbindung zu erfahren.
Daher wurden 3 Versuche mit unterschiedlicher Fragestellung durchgeführt: Bestimmung der Überlebenszeit, der Abhängigkeit der ^{125}J-Insulinbindung von der Inkubationszeit und der ^{125}J-Insulinbindung in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration.

a) Überlebenszeit von Fettzellen in Gegenwart von 1000µg/ml Inositphosphatid aus Sojabohnen

Das Lipid wurde in Form einer ultrabeschallten Suspension zum Reaktionsansatz zugegeben und nach Präinkubation zwischen 5 und 65 min. durch Zugabe von Radiojodinsulin (auf 82pMol/l) eine 30-minütige Inkubation gestartet.
Die nach dem Messen der zellgebundenen Radioaktivität erhaltenen Ergebnisse sind in Abb.26a und b graphisch dargestellt, zum Vergleich daneben die Kurve in Abwesenheit von "PI".
Der Verlauf der spezifischen Bindung in Abb.26a zeigt eine etwas geringere Bindungsabnahme als beim Kontrollansatz, wenngleich die Standardabweichung wesentlich größer ist.
Die unspezifische Bindung in Abb.26b bildet eine Minimumkurve mit kleinstem Wert zwischen 25 und 35 Minuten Präinkubation, im Gegensatz zur konstant bleibenden Kontrollserie.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß "PI" die Membran stabilisiert, dafür aber zu einer Zellaggregation führt; der zeitabhängige Verlauf der unspezifischen Bindung deutet auf eine allmähliche Veränderung entweder der Zellmembranen oder der zugegebenen Lipidsuspension.

b) Zeitabhängigkeit der ^{125}J-Insulinbindung an den Rezeptor in Anwesenheit von 1000µg/ml Inositphosphatid

Die Zugabe erfolgte wie unter a), doch wurde die Präinkubationszeit bei 10 min. konstant gehalten und anschließend nach Zugabe von Radiojodinsulin zwischen 5 und 65 min. inkubiert. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abb.27a und b dargestellt, wieder verglichen mit den Ergebnissen ohne "PI". In Abb.26 und Abb.27 werden die Werte als % der maximalen spezifischen ^{125}J-Insulinbindung angegeben.

Die Einstellung des Gleichgewichtes erfolgt in Gegenwart von "PI" viel langsamer als in dessen Abwesenheit: Das Maximum ist nach 65 Minuten noch nicht erreicht. Diese "Bremsung" spricht ebenfalls für eine Fluiditätsveränderung der Membran. Die ebenfalls mit der Zeit zunehmende unspezifische Bindung kann noch nicht erklärt werden.

c) Einfluß der Inositphosphatid-Konzentration auf die ^{125}J-Insulin-Rezeptorbindung an Fettzellen

Es wurde eine Verdünnungsreihe der "PI"-Suspension von 1000 bis 1µg/ml hergestellt und damit eine Dosis-Wirkungskurve aufgenommen. Präinkubiert mit "PI" wurde 10 min., dann 35 min. mit ^{125}J-Insulin (82 pMol/l). Parallel dazu wurde die unspezifische Bindung ermittelt, indem 5 min. vor der Radiojodinsulinzugabe 37 mMol/l natives Insulin zugegeben wurden.

Die Ergebnisse sind in Abb.28 graphisch dargestellt, indem die gebundenen ^{125}J-Insulinkonzentrationen (als % der gebundenen Konzentration in Abwesenheit von "PI") gegen die "PI"-Konzentrationen (in logarithmischer Auftragung) aufgetragen wurden.

Die sonderbare Minimumkurve der spezifischen Bindung ist nicht durch Schwankungen der unspezifischen Bindung verursacht, wie deren stetiger Verlauf zeigt. Jedoch dürfte es sich um die Überlagerung zweier entgegengesetzter Effekte handeln, seien es nun Einflüsse auf die Membranfluidität oder die Membran-

ladung oder gar spezifische Wechselwirkungen mit dem Insulinrezeptor oder seiner Umgebung.
Eine Weiterverfolgung dieses Problems bleibt künftigen Arbeiten vorbehalten; wichtig für diese Arbeit ist lediglich, daß die Effekte der Plasmamembran mit der standardisierten Methode verfolgt werden konnten.

Abb.26a

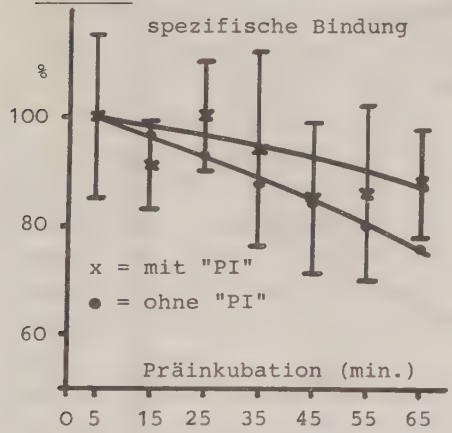


Abb.26b

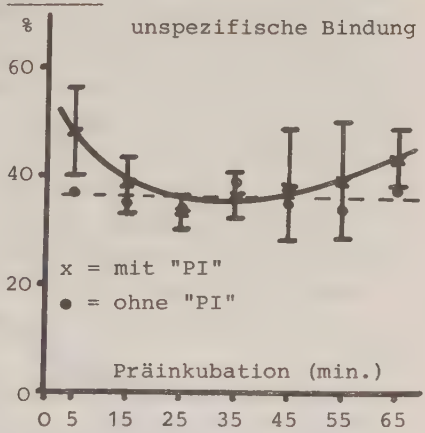


Abb.27a

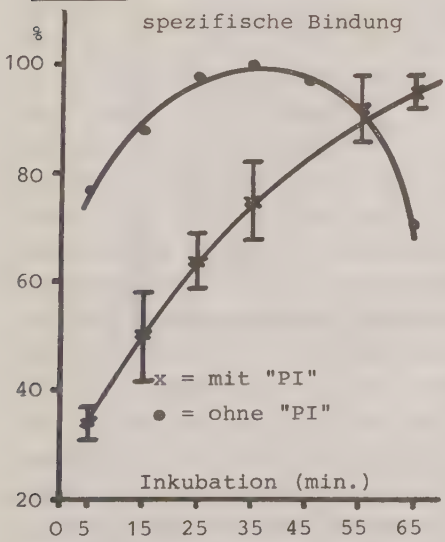


Abb.27b

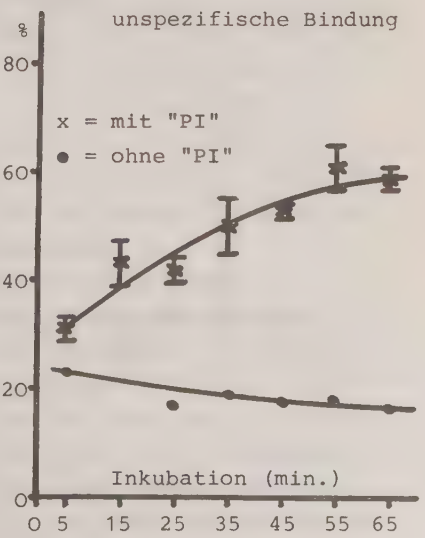
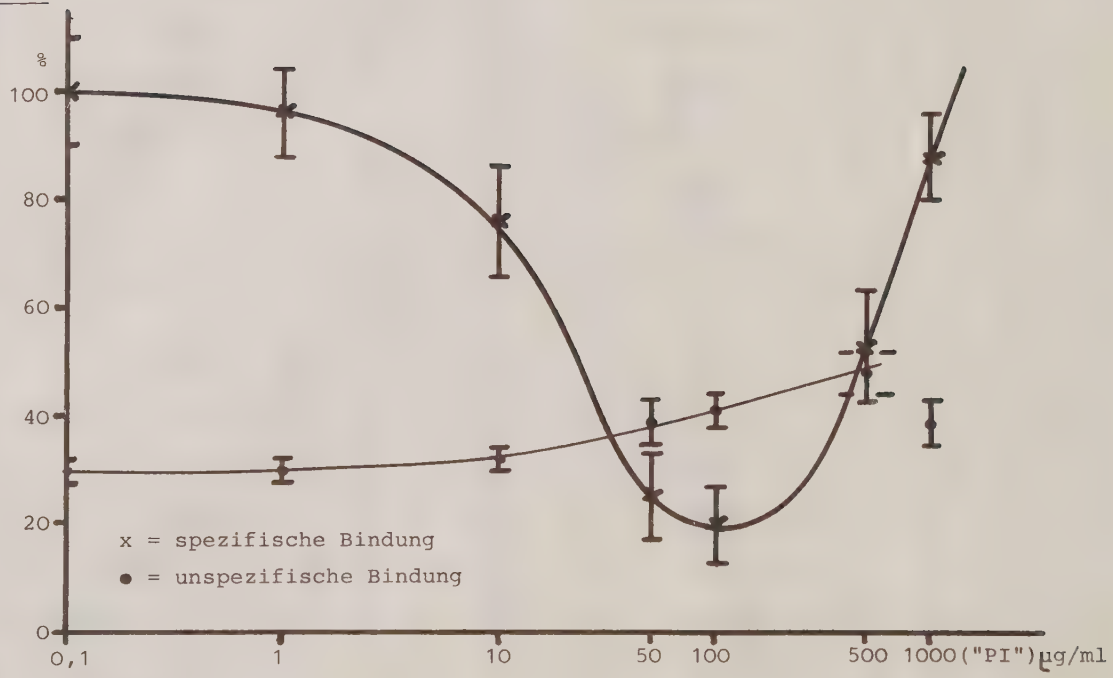


Abb.28


%
100
80
60
40
20
0
x = spezifische Bindung
● = unspezifische Bindung
0,1
1
10
50
100
500
1000
("PI")µg/ml

4.3. Einfluß von niedermolekularen blutzuckersenkenden Basen auf die ^{125}J-Insulin-Rezeptorbindung an Fettzellen

Zusammengefaßt sind in diesem Abschnitt drei Verbindungen:
Synthalin (1,10-diguanidinodecan),
11-Guanidino-undecansäure-dimethylamid und
Butylbiguanid,
die strukturell wenig Gemeinsamkeit aufweisen, außer daß sie durch Guanidino- oder Biguanid-Gruppen basischen Charakter tragen. Außerdem ist ihnen gemeinsam, daß von allen dreien im Tierversuch eine Blutzuckersenkung erwiesen ist (12., 69.); der Wirkmechanismus ist bisher allerdings noch unbekannt. So läßt sich also auch eine Wirkung auf den Insulinrezeptor, direkt oder über die Membran, nicht ausschließen.
Diese Möglichkeit soll hier untersucht werden. Dazu wurde einmal eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen, die beim Butylbiguanid bis 1106 µMol/l reichte, beim 11-Guanidinoundecansäure-dimethylamid bis 700 µMol/l und beim Synthalin bis 604 µMol/l reichte.
Die Abbn.29a-c zeigen die Ergebnisse dieser Tests:
Nur Butylbiguanid zeigt eine geringe, schwerlich als signifikant zu bezeichnende Senkung der zellgebundenen ^{125}J-Insulinmenge. Ob diese Senkung durch "Allosterie" an der Membran oder Zellverlust (Toxizität) zustande kommt oder ob sie ein direkter Rezeptoreffekt ist, sollten die beiden folgenden Experimentserien klären.
Zuerst einmal wurde die ^{125}J-Insulinbindung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (nach 6 min. Präinkubation mit der jeweiligen Höchstkonzentration der Testsubstanz aus der vorhergehenden Dosis-Wirkungs-Kurve) bestimmt.
Die Abbn.30a-c zeigen die Ergebnisse dieser Tests:
Nur beim Butylbiguanid ist so etwas wie ein Maximum (bei 15 min.) zu erkennen, beide anderen Kurven sinken von Anfang an. Der Verlauf deutet aber auf eine starke Toxizität aller drei Substanzen bei den eingesetzten Konzentrationen hin.
Bestätigt wird das durch die in den Abbn.31a-c dargestellte Bestimmung der Überlebenszeiten von Fettzellen in Abhängigkeit von der Präinkubationszeit mit der auch im vorigen Test eingesetzten Konzentration an Testsubstanz: Fast alle Zellen

lysieren innerhalb der Testzeit. Dieser Effekt war auch bei visueller Beurteilung der Proben erkennbar.
In den Abbn.30b, 31b und c ist im Gegensatz zu den übrigen Darstellungen nicht die Spezifische, sondern die Gesamtbindung von ^{125}J-Insulin aufgetragen, da die Kurven für die Unspezifischen Bindungen bisher unerklärliche Effekte zeigen, die aber auf eine Emulgierung von ^{125}J-Insulinlösung mit freigesetzten Triglyceriden unter Vermittlung von nativem Insulin in hoher Konzentration deuten.
Aus den gefundenen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die drei untersuchten Verbindungen Synthalin, 11-Guanidino-undecansäure-dimethylamid und Butylbiguanid weder direkt noch indirekt mit dem Insulinrezeptor an Fettzellen wechselwirken und daß selbst die relativ geringe Wirkung des Butylbiguanides im Dosis-Wirkungs-Test auf seiner (in diesen Konzentrationen) toxischen Eigenschaft beruht.

Abb.29a

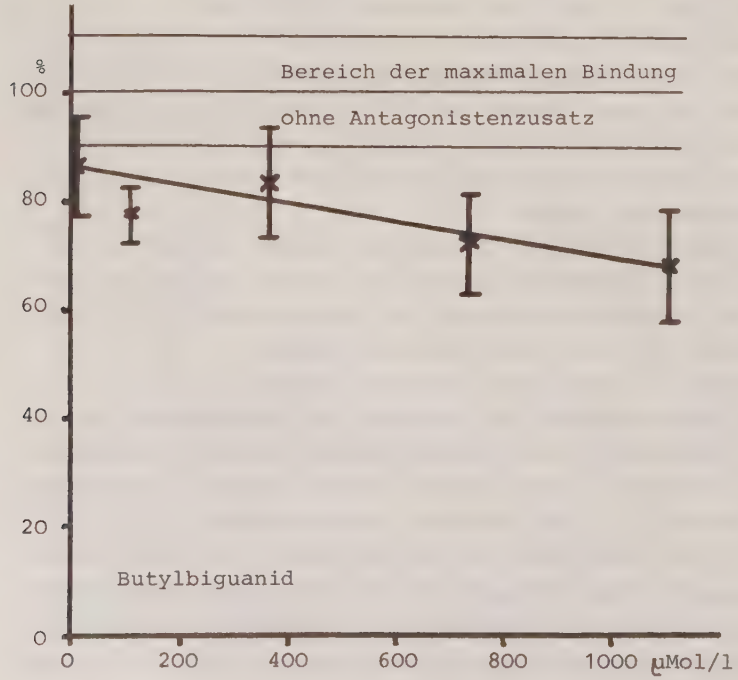


Abb.29b

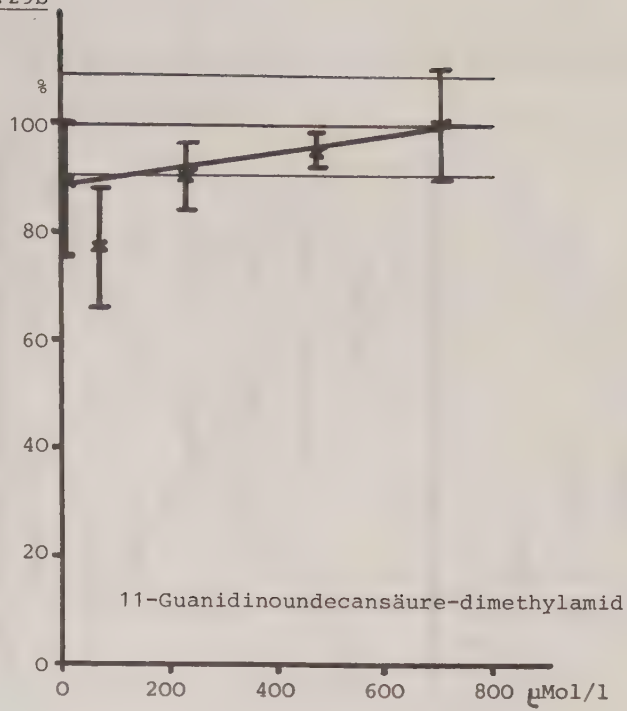


Abb.29c

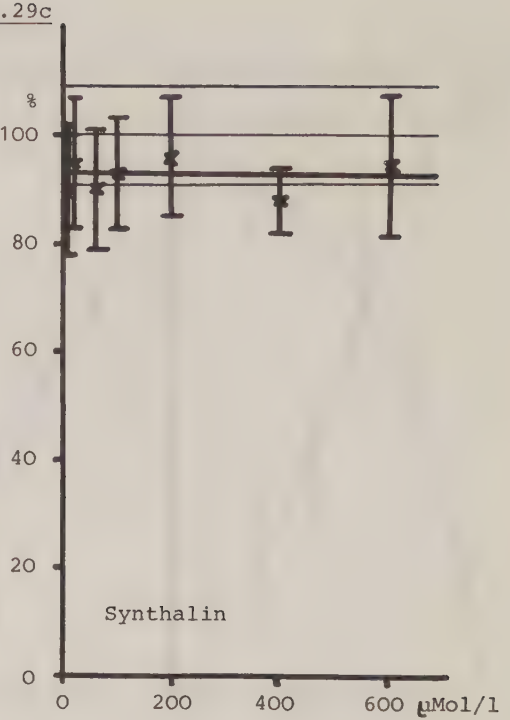


Abb. 30a

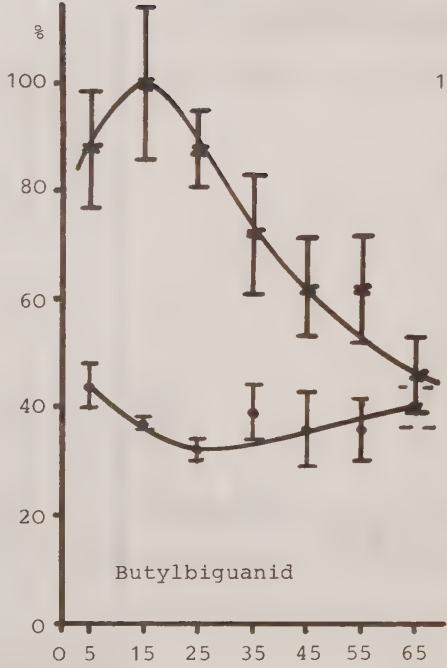


Abb. 30b

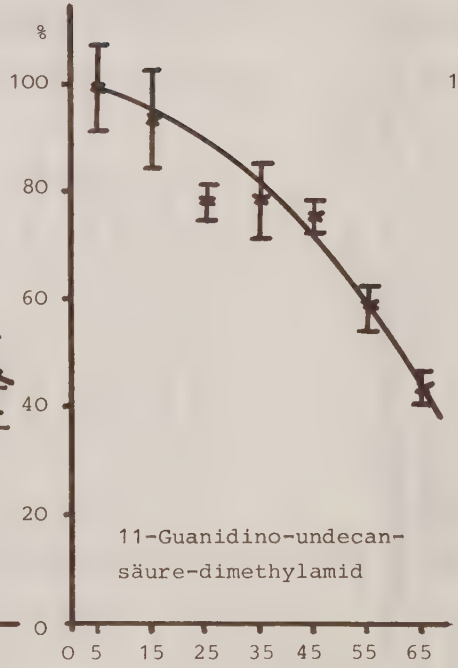


Abb. 30c

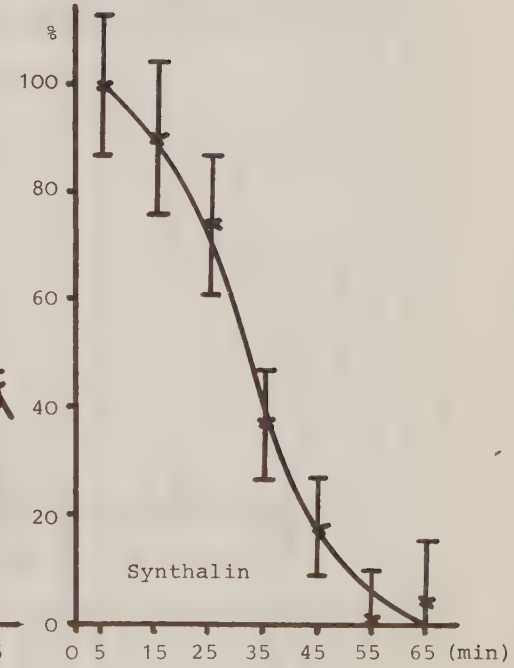


Abb.31a

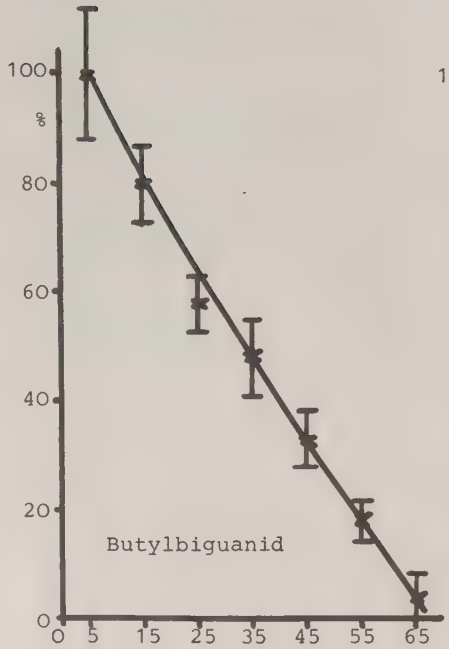


Abb.31b

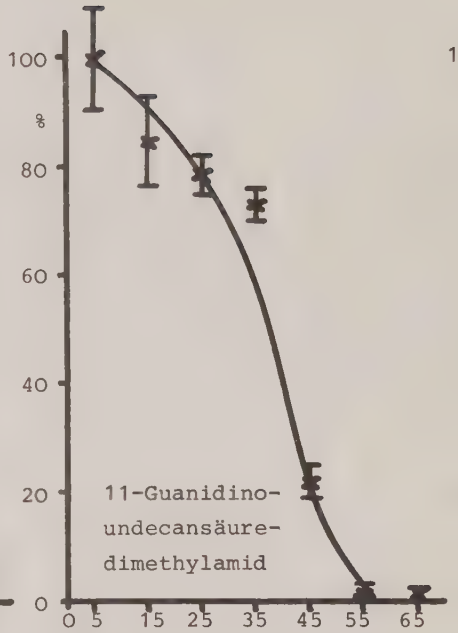
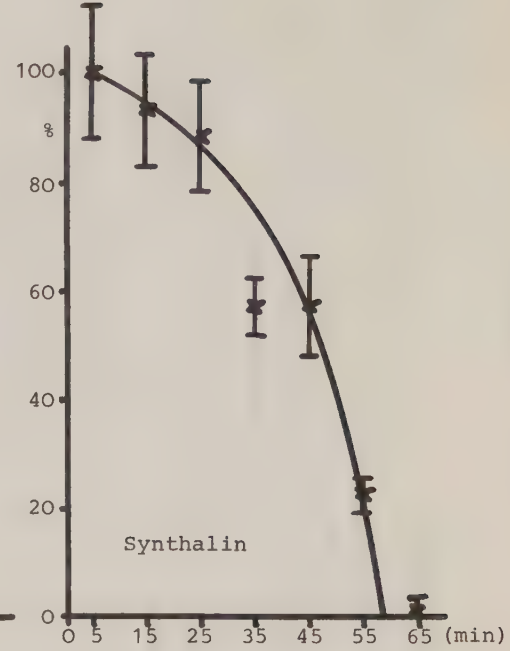


Abb.31c



III. Dikussion

1. Versuchsbedingungen

Der Insulin-Rezeptor-Bindungstest an Fettzellen nach Gliemann und Gammeltoft (41.) wurde verändert, so daß die Möglichkeiten der Methode stark erweitert wurden.

Die wichtigsten Veränderungen waren:

- Zusatz von Trypsininhibitor aus Sojabohnen bei der Gewebsdesintegration mit Collagenase zum Schutz des Insulinrezeptors vor tryptischem Abbau.
- Inkubation in Gefäßen mit größerem Durchmesser (21,5 mm), um den Gasaustausch zu erleichtern; größere Ansatzdimensionierung (1,4 ml), die 6 aliquote Meßproben zu je 0,2 ml liefert, dadurch Verringerung der Meßfehler.
- Inkubation bei 37°C zur besseren Vergleichbarkeit mit der Glukoseoxidation; gleichzeitig schnellere Einstellung des Gleichgewichtes, dadurch lassen sich mehr Proben pro Zeiteinheit untersuchen.
- Unterteilung des Versuchsablaufs in Präinkubation mit dem "Antagonisten" und Inkubation mit dem Radiojodinsulin (Indikator); durch Variation dieser beiden Zeiten bei konstanten Konzentrationen lassen sich auch Membraneffekte der "Antagonisten" erfassen: Variation der Präinkubationszeit bei konstanter Inkubationszeit zeigt Membrantoxizität der Testsubstanz an; Variation der Inkubationszeit bei konstanter Präinkubationszeit zeigt Veränderungen des Membranzustandes (z.B. Fluidität) durch die Testsubstanz an (falls nicht membrantoxische Effekte überwiegen). Beide Möglichkeiten waren bei den bisherigen Rezeptortests an Fettzellen nicht gegeben.
- Die Verlegung der Konzentrationen an Zellen und ^{125}J-Insulin in Größenordnungen mit linearer Abhängigkeit erlaubt eine rechnerische Korrektur von Pipettierfehlern im engeren Rahmen.
- Bei der Auswertung wurden die Antagonistenkonzentrationen bei halbmaximaler Verdrängung des gebundenen ^{125}J-Insulins (K_v oder ED_{50}) mit den nach Dixon erhaltenen K_i-Werten verglichen. Es zeigte sich eine für halbquantitative Aussagen hinreichende Korrelation.

2. Verdrängungstests

Bei diesen Tests wurde die Abhängigkeit der ^{125}J-Insulinbindung an den Insulinrezeptor von Fettzellen in Abhängigkeit von der Antagonistenkonzentration bestimmt.

In Tab.14 sind die wichtigsten Ergebnisse der Tests mit Substanzen mit Beziehung zur Insulinsequenz zusammengefaßt, und zwar in % Insulinaktivität (% IA) ausgedrückt:

$$\% \text{ IA}(K_i) = \frac{100\ K_i(\text{Insulin})}{K_i(\text{Substanz}} \text{ bzw. } \% \text{ IA}(ED_{50}) = \frac{100 ED_{50}(\text{Insulin})}{ED_{50}(\text{Substanz})}$$

und in Abb.32 graphisch nebeneinandergestellt. Dabei erkennt man, daß die Ergebnisse aus ED_{50} und K_i durchaus als näherungsweise proportional betrachtet werden können, nur daß bei den Werten aus ED_{50} die Spreizung etwas günstiger ist.

Beim Vergleich dieser Werte mit den in Tab.14 ebenfalls angegebenen Literaturwerten für den Mäusefalltest fällt die weitgehende Übereinstimmung zwischen beiden auf.

Einzige Ausnahme ist dabei das DPPI-Lys mit mehr als der doppelten Aktivität im Rezeptortest. Diese relativ starke Bindung bei relativ geringer Falltest-Aktivität könnte ein weiterer Hinweis auf die Sonderstellung der Guanidinogruppe des Arginin (B22) sein: Eine andere basische Gruppe kann zwar das Arginin in seiner Rezeptorbindungsfunktion (Affinität des Insulinderivates) ersetzen, nicht aber bei der Auslösung eines Stoffwechseleffektes (intrinsic activity des Insulinderivates.

Die Ergebnisse legen, da in den Bindungstests eine gewisse Austauschbarkeit von basischen Funktionen durch Erhöhung der Zahl der aromatischen Funktionen festzustellen ist, den Verdacht nahe, daß diese Zone des Insulinmoleküls (B22-26) besonders zur Aufrechterhaltung einer bindungsgünstigen Konformation des Hormons durch ionische und aromatische Wechselwirkungen notwendig ist. Jedoch scheint es so, daß die Rezeptorbindungsregion zu einem wichtigen Teil auf der B-Kette zu suchen ist.

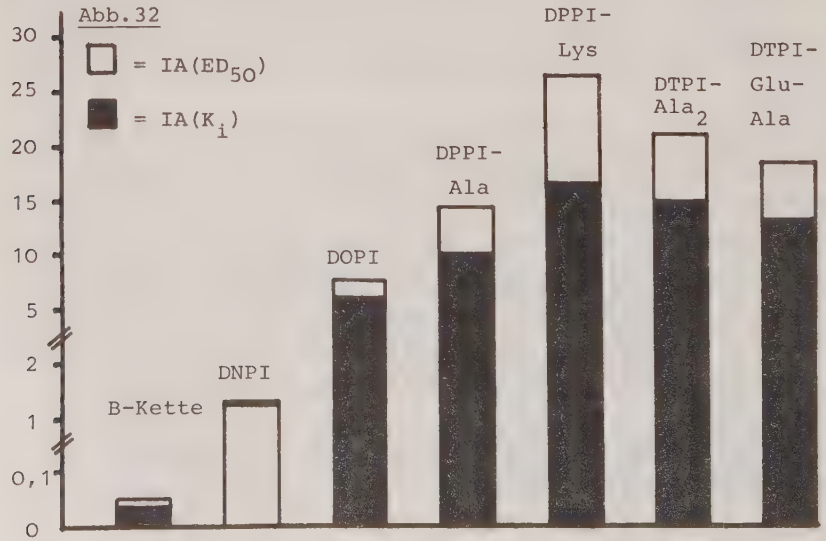
Bestätigt werden konnten die Ergebnisse von Weitzel et al. an anderen Testsystemen, daß

1. Arginin (B22) essentiell für eine starke Wirkung ist (6.),
2. eine Drei-Stufen-Aktivitätszunahme parallel zum Einbau der drei aromatischen Reste Phe(B24)-Phe(B25)-Tyr(B26) in das Insulinderivat zu beobachten ist (5.) und
3. diese beiden Effekte voneinander weitgehend unabhängig sind (7.).

Tab.14

Stoff	Rezeptortest % IA(ED_{50})	Rezeptortest % IA(K_i)	Mäusefalltest % IA(Lit.)
natives Insulin	100	100	100
B-Ketten-S-Sulfon	0,05	0,04	-
"DNPI"	1,20	1,27	3 (6.)
"DOPI"	7,14	6,21	4 (5.)
"DPPI-Ala"	11,70	7,17	8-10 (6.,7.)
"DPPI-Lys"	26,79	16,67	13 (7.)
"DPPI-Arg"	-	-	34-36 (5.,6.)
"DTPI-Ala_2"	20,83	14,87	25 (6.)
"DTPI-Glu-Ala"	18,75	13,25	-
"DTPI-Arg-Ala"	-	-	91 (5.)

Abb.32



Bei der Untersuchung der synthetischen Oligopeptide mit Beziehung zur Insulin-B-Kettenstruktur wurde keinerlei Wechselwirkung mit dem Rezeptor beobachtet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von S.Kubota et al. (65.), denen es gelang, mit Peptiden der Partialsequenz B23-25 (Gly-Phe-Phe) Insulindimere zur Dissoziation zu bringen, spricht das gegen die Theorie von T.L.Blundell et al. (63,64.), daß die Insulin-Rezeptor-Bindungsregion mit der Insulin-Dimer-Region identisch oder nahe verwandt sei.
Der Hexamethylester des Insulins und die Pentamethylester von DOPI und DNPI zeigten statt einer Verdrängung des ^{125}J-Insulin vom Rezeptor eine Bindungs-"Stimulierung". Da dieser Effekt mit abnehmender Peptidkettenlänge ebenfalls abnimmt und sich durch Zugabe nativen Insulins weitgehend zurückdrängen läßt, scheint eine direkte Wechselwirkung des Radiojodinsulins mit dem Methylester die wahrscheinlichste Möglichkeit.
Es wäre zu prüfen, ob man aus diesem Zufallsbefund nicht ein synthetisches Modellsystem zur Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung des Insulins entwickeln kann.

3. Tests mit Substanzen ohne Beziehung zur Insulinsequenz

Bei diesen Substanzen war durchweg keine spezifische insulinähnliche Wechselwirkung mit dem Insulinrezeptor an Fettzellen zu beobachten.
Beim Spermidin lassen sich "allosterische" Einflüsse auf den Insulinrezeptor nicht ganz ausschließen, wenngleich diese bis zur untersuchten Maximalkonzentration von 1 mMol/l nicht nachweisbar sind.
Hingegen sind für das C_6-Homoagmatin und das 6-Guanidinohexansäure-dimethylamid keinerlei Wirkungen außer einer Toxizität des ersteren zu finden. Die Beeinflussung der Glukoseaufnahme und -oxidation in Fettzellen hat daher sicher ihre Ursache in Wechselwirkungen mit "Rezeptoren" im Zellinneren.
Für das Membranlipid Inositphosphatid wurden, wie zu erwarten, besonders starke Einwirkungen auf die Zellmembran gefunden. Einmal wurde die Membran"fluidität" verringert, was sich zum

anderen auch in einer Konservierung der Zellen ("Antitoxizität") äußert. Der sonderbare Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem reproduzierbaren Minimum muß bei späteren Arbeiten noch näher untersucht werden.

Für die drei blutzuckersenkenden niedermolekularen Basen Butylbiguanid, Synthalin und 11-Guanidinoundecansäure-dimethylamid ist auf jeden Fall nach den Ergebnissen eine spezifische Wechselwirkung mit dem Insulinrezeptor auszuschließen. Einflüsse auf die "Membranfluidität" sind bei subtoxischen Konzentrationen nicht feststellbar, in toxischen Konzentrationen überwiegen die toxischen Effekte, so daß eine eindeutige Antwort nicht möglich ist.

Die toxische Wirkung der drei Substanzen nimmt zu vom Butylbiguanid über das Synthalin zum 11-Guanidinoundecansäure-dimethylamid.

C. Zusammenfassung

1. Durch Variation der Versuchsbedingungen lassen sich mit der hier vorgestellten Methode nebeneinander die direkte Einwirkung einer Substanz auf den Insulinrezeptor durch Verdrängung von ^{125}J-Insulin und die indirekte Einwirkung auf den Rezeptor durch Veränderung des Membranzustandes bestimmen. Unabhängig davon läßt sich noch eine toxische Wirkung, speziell auf die Fettzellmembran, erfassen. Diese könnte eine scheinbare Verdrängung einfach durch Zellverlust (Lyse) und damit Senkung der Rezeptorkonzentration, vorspiegeln.
Diese 3 Effekte lassen sich getrennt voneinander ermitteln. Damit ist diese Methode trotz der großen Schwankungsbreite biologischer Experimente geeignet, wenn nicht im exakten Zahlenwert, so doch in der Tendenz genaue, zuverlässige und reproduzierbare Aussagen mit geringem Aufwand zu liefern.

2. Die Ergebnisse der Untersuchung an partiell abgebauten Insulinmolekülen zeigten,daß durch Abspaltung der Sequenz B23-30 etwa 93-94% der Bindungsaktivität nativen Insulins verloren gehen; wird auch noch das Arginin B22 abgespalten, sind es sogar 99%, was die Notwendigkeit dieser Gruppe unterstreicht. Eine Spaltung des Insulinmoleküls in A- und B-Ketten-S-Sulfonate zeigt totalen Verlust der Rezeptoraktivität für die A-Kette und Erhaltung von nur 0,05% für die B-Kette.

3. Die Ergebnisse der Untersuchung an semisynthetischen Insulinderivaten zeigte eine 10fache Zunahme der Bindung bei Kopplung des Peptides Ala-Gly-Phe-Phe an das Desnonapeptidinsulin und eine weitere Verdopplung der Wirkung bei Hinzufügen der Gruppe -Tyr-Ala. Damit sind zwei Stufen der 3-Stufen-Aktivitätszunahme bei Kettenverlängerung von B24 auf B26 auch im Rezeptortest nachgewiesen. Semisynthetische Insulinmoleküle mit neutralem (Ala) oder saurem (Glu) Aminosäurerest in Stellung B22 unterscheiden sich in ihrer Aktivität nur geringfügig, werden aber an Aktivitätszunahme gegenüber dem Desnonapeptidinsulin weit übertroffen (2,5-fach) durch ein Produkt mit basischer Aminosäure (Lys) an B22.
Daraus läßt sich schließen, daß der für die Rezeptorbindung entscheidende Bereich des Insulins auf der B-Kette lokalisiert ist und wahrscheinlich die aromatischen Reste B24-26 einschließt. Wie weit das Arginin B22 dabei beteiligt ist und ob

es nicht eher zur Aufrechterhaltung einer bindungsgünstigen Konformation des Hormons dient, kann noch nicht abschließend geklärt werden.

4. Es konnte keinerlei Wechselwirkung der eingesetzten Oligopeptide (Arg-Gly-Phe-Phe, Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala und Derivate, und $(Gln\text{-}His\text{-}Leu\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Ser\text{-}His)_2$) mit dem Insulinrezeptor festgestellt werden. Das bestätigt einmal die Annahme von Weitzel et al. (3.), daß biologische Wirkungen dieser kleinen, nicht blutzuckersenkenden Peptide unabhängig vom Insulinrezeptor ausgelöst werden; zum anderen zeigen die Versuche, daß das rezeptorbindende Zentrum des Insulins mehr umfaßt als nur die Gruppierung B22-26 (Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-).

5. Zu den Effekten der niedermolekularen nicht blutzuckersenkenden Basen mit insulinähnlicher Aktivität im Fettzelltest (Spermidin, C_6-Homoagmatin und 6-Guanidinohexansäuredimethylamid) wurde festgestellt, daß diese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht über den Rezeptor wirken, da eine signifikante Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Rezeptor selbst durch Konzentrationen bis 1 mMol/l nicht erreicht werden konnte. Bei dieser Konzentration erwies sich allein das C_6-Homoagmatin als toxisch.

6. Das Inositphosphatid aus Sojabohnen als nicht blutzuckersenkende nichtbasische Verbindung scheint die Zellmembran zu stabilisieren, wodurch die Überlebenszeit verlängert wird, und sie gleichzeitig starrer zu machen, was sich in einer langsameren Einstellung des ^{125}J-Insulin-Bindungsgleichgewichtes ausdrückt.

7. Zu den Effekten der niedermolekularen Basen mit blutzuckersenkender Wirkung (Butylbiguanid, Synthalin und 11-Guanidinoundecansäuredimethylamid) wurde festgestellt, daß auch diese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht über den Insulinrezeptor wirken, da eine signifikante Verdrängung von ^{125}J-Insulin vom Rezeptor selbst durch zelltoxische Konzentrationen nicht erreicht werden konnte. Auch ein Einfluß der niedermolekularen Basen auf die Zellmembran, der rezeptorwirksam sein könnte, war bis zu toxischen Konzentrationen nicht festzustellen. Daher wirken diese Substanzen weder direkt noch indirekt auf den Insulinrezeptor.

D. Literatur

1. G.Weitzel, K.Eisele, H.Guglielmi, W.Stock, R.Renner; Hoppe-Seyler's Z. 352, 1735-8 (1971)
2. G.Weitzel, K.Eisele, V.Schulz, W.Stock; Hoppe-Seyler's Z. 354, 321-30 (1973)
3. G.Weitzel, K.Eisele, W.Stock; Hoppe-Seyler's Z. 356, 583-90 (1975)
4. K.Eisele; Hoppe-Seyler's Z. 356, 845-54 (1975)
5. G.Weitzel, F.U.Bauer, K.Eisele; Hoppe-Seyler's Z. 357, 187-200 (1976)
6. G.Weitzel, F.U.Bauer, A.Rehe; Hoppe-Seyler's Z. 358, 1573-82 (1977)
7. G.Weitzel, F.U.Bauer, K.Eisele; Hoppe-Seyler's Z. 359, 945-58 (1978)
8. F.U.Bauer; Diss.rer.nat. (1974) Tübingen
9. A.Rehe; Diss.rer.nat. (1975) Tübingen
10. A.Hadjanghelou; Diss.rer.nat. (1980) Tübingen
11. G.Weitzel, B.Pfeiffer, W.Stock; Hoppe-Seyler's Z. 361, 51-60 (1980)
12. G.Weitzel, A.M.Fretzdorff, W.Stock; Hoppe-Seyler's Z. 361, 41-50 (1980)
13. J.M.Olefsky, H.Chang; Diabetes 27, 946-58 (1978)
14. H.Keilacker, S.Knospe, W.Besch, M.Ziegler; Karlsruher Symp. Diabetesfragen 9th 2, 368-71 (1977)
15. J.M.Olefsky, H.Chang; Endocrinology (Balt.) 104, 462-6 (1979)
16. J.M.Hammond, L.Jarrett, I.K.Mariz, W.H.Doughaday; Biochem.Biophys.Res.Commun. 49, 1122-28 (1972)
17. P.Gorden, J.R.Neville III, C.R.Kahn, J.A.Archer, M.Lesniak, C.Hendricks, D.M.Neville Jr., J.Roth; Pharmacol.Review 25, 179-87 (1973)
18. K.Megyesy, C.R.Kahn, J.Roth, E.R.Froesch, R.E.Humbel, J.Zapf, D.M.Neville Jr.; Biochem.Biophys.Res.Commun. 57, 307-15 (1974)
19. C.R.Kahn, P.Freychet, J.Roth, D.M.Neville Jr.; J.Biol.Chem. 249, 2249-57 (1974)

20. P.DeMeyts, J.Roth;
Biochem.Biophys.Res.Commun. 66, 1118-26 (1975)
21. P.Freychet; Med.Hyg. 34, 594-7 (1976)
22. L.Jarett, R.M.Smith; Cellmembr.Recept.Viruses, Antigens, Antibodies, Polypept.Hormone, Small Mol. 91-104 (1976)
23. P.DeMeyts; s. 22. 17-32
24. P.Gorden; Life Sci.Res.Rep. 3, 87-94 (1976)
25. S.Jacobs, P.Cuatrecasas; BBA 433, 482-95 (1976)
26. P.Freychet; Diabetes Metab. 1, 57-68 (1975)
27. T.Kono; Saishin Gaku 30, 2089-94 (1975)
28. P.DeMeyts, A.R.Bianco, J.Roth; J.Biol.Chem. 251, 1877-88 (1976)
29. G.P.E.Tell, F.Krug,P.Cuatrecasas; Handb.Exp.Pharmacol. 32, Pt2(Insulin) 249-65 (1975)
30. P.Freychet; Methods Mol.Biol. 9, Pt2(Methods Recept.Res.) 385-428 (1976)
31. M.D.Hollenberg,P.Cuatrcasas; Methods Mol.Biol. 9, Pt2 429-77 (1976)
32. B.H.Ginsberg, C.R.Kahn, J.Roth, P.DeMeyts; Biochem.Biophys.Res.Commun. 73, 1068-74 (1976)
33. Peking Institute of Zoology; Sci.Sin. 20, 794-802 (1977)
34. Peking Institute of Zoology; Tung Wu Hsuen Pao 23, 352-6 (1977)
35. P.DeMeyts, M.Waelbroeck; Proc.FEBS-Meet. 1977 45, 319-23 (1978)
36. K.D.Hepp; Proc.FEBS-Meet. 1977 45, 221-8 (1978)
37. I.D.Goldfine; Life Sci. 23, 2639-48 (1978)
38. M.D.Hollenberg; Advances in Protein Chemistry 30, 251-451 (1976)
39. M.Dixon; Biochem.J. 55, 170-1 (1953)
40. H.Bisswanger; Theorie und Methoden der Enzymkinetik Verlag Chemie (1979)
41. J.Gliemann, S.Gammeltoft, J.Vinten, G.Hjeresen, T.Johansen; J.Biol.Chem. 250, 3368-74 (1975)
42. R.Koch; Diplomarbeit (1978) Tübingen
43. J.S.Glover, D.N.Salter, B.P.Shepherd; Biochem.J. 103, 120-8 (1967)

44. B.Schneider, E.Straus, R.S.Yalow; Diabetes 25, 260-7 (1976)
45. C.J.Garratt, D.M.Harrison, M.Wicks; Biochem.J. 126, 123-31 (1972)
46. J.Gliemann, S.Gammeltoft; Diabetologia 10, 105-13 (1974)
47. J.Gliemann, S.Gammeltoft, J.Vinten; Isr.J.Med.Sci. 11, 656-63 (1975)
48. T.Wieringa, H.M.J.Krans; BBA 538, 563-70 (1978)
49. P.Cuatrecasas; J.Biol.Chem. 246, 6532-42 (1971)
50. J.Gliemann, J.Vinten, A.Volund; J.Physiol. 236, 499-516 (1974)
51. G.Jerums, D.J.Galton; Horm.Metab.Res. 6, 242-3 (1974)
52. T.Kono, F.W.Barham; J.Biol.Chem. 246, 6204-9 (1971)
53. T.Kono, F.W.Barham; J.Biol.Chem. 246, 6210-6 (1971)
54. T.Kono; J.Biol.Chem. 244, 1772-8 (1969)
55. T.Kono; J.Biol.Chem. 244, 5777-84 (1969)
56. P.Cuatrecasas; J.Biol.Chem.246, 6522-31 (1971)
57. W.Stock; Zeitschr.f.Naturf. 28c, 319-21 (1973)
58. T.Kono; Biochemistry 7, 1106-14 (1968)
59. E.Schröder, C.Rufer, R.Schmiechen; Arzneimittelchemie Georg Thieme Verlag Stuttgart (1976)
60. A.J.Clark; J.Physiol.(london) 61, 530-547
61. L.Michaelis, H.Davidsohn; Biochem.Z. 35, 386 (1911)
62. L.Michaelis, M.L.Menten; Biochem.Z. 49, 333-369 (1913)
63. R.A.Pullen, D.G.Lindsay, S.P.Wood, I.J.Tickle, T.L. Blundell, A.Wollmer, D.Brandenburg, H.Zahn, J.Gliemann, S.Gammeltoft; Nature 259, 369-73 (1976)
64. C.R.Beddell, G.C.Sheppey, T.L.Blundell, K.Sasaki, S.Dockerill, P.J.Goodford; Int.J.Prot.Res. 9, 161-5 (1977)
65. S.Kubota, C.T.Chang, T.Samejma, J.T.Yang; JACS 98 2677-8 (1976)
66. Feng You-min et al. ; Insulin; Chemistry, Structure and Function of Insulin and related Hormons . W.DeGruyter Berlin,N.Y. 1980 455-60

67. M.P.Czech, B.K.Waters; Diabetes 37th Annual Meeting Report No.57
68. R.H.Michell; BBA 415, 81-147 (1975)
69. Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Herausgeber O.Eichler, A.Farah, H.Herken, A.D.Welch; Band XXIX, Herausgeber H.Maske; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1971)

LEBENSLAUF

Am 7. März 1949 wurde ich, Wolfgang Eichler, als Sohn des Wolfgang Eichler und seiner Ehefrau Henny, geb. Schuck, in Wiesbaden geboren.
1955 wurde ich in Wiesbaden eingeschult und besuchte nach 4 Grundschuljahren das Leibniz-Gymnasium, Wiesbaden, und ab 1967 das Humboldt-Gymnasium, Wiesbaden wo ich 1969 das Abitur ablegte.
Zum Wintersemester 1969/70 wurde ich für das Studium der Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, immatrikuliert.
Im Sommersemester 1972 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen das Studium der Biochemie auf, dessen Abschluß die Diplomprüfung im April 1977 bildete.
Seit Mai 1977 arbeitete ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Günther Weitzel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen an meiner Dissertation "Untersuchungen am Insulinrezeptor von isolierten Fettzellen". Diese Arbeit habe ich im Sommersemester 1980 abgeschlossen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Physiologische Chemie:		H.Guglielmi, D.Mecke, G.Weitzel
Organische Chemie	:	E.Bayer, W.Heitz, E.Müller, M.Hanack
Anorganische Chemie	:	R.Bock, G.Gattow, W.Rüdorff
Physikalische Chemie	:	G.Kortüm, W.Liptay, H.Mauser, G.V.Schulz
Mikrobiologie	:	V.Braun, H.Zähner
Genetik	:	W.Seyffert
Mathematik	:	H.G.Zachmann
Physik	:	F.Gönnenwein, F.Hufnagel
Botanik	:	H.Metzner
Zoologie	:	K.G.Grell, F.-P.Möhres
Anatomie	:	K.Mörike

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Forststraße 58 Telefon 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1